

---

Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Biología Molecular

**Papel de los DAMPs mitocondriales en la generación  
de tolerancia cruzada en macrófagos: estudio en  
pacientes de Síndrome Coronario Agudo**

**TESIS DOCTORAL**

**Irene Fernández Ruiz**

**Madrid, 2012**

**Universidad Autónoma de Madrid**

---





---

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

**Papel de los DAMPs mitocondriales en la generación  
de tolerancia cruzada en macrófagos: estudio en  
pacientes de Síndrome Coronario Agudo**

Memoria presentada por Irene Fernández Ruiz para optar al grado de  
Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de tesis:

Dr. Eduardo Manuel López Collazo

Dr. Francisco Arnalich Fernández

**Unidad de Investigación-IdiPaz**

**Servicio de Cardiología**

**Servicio de Medicina Interna**

**Hospital Universitario de la Paz**

**Madrid 2012**

---



*A mi madre*



*Espero saber demostrar en palabras mi agradecimiento a todas las personas que, de una u otra manera, han hecho posible esta Tesis Doctoral.*

*En primer lugar quería agradecer al Dr. Eduardo López-Collazo y al Dr. Francisco Arnalich, directores de esta Tesis. Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar con vosotros, por abrirme las puertas de la carrera científica, por apoyarme y por creer y confiar en mí.*

*Quiero agradecer al Dr. Raúl Moreno, jefe de sección de Hemodinámica, y al Dr. José Luis López-Sendón, jefe del servicio de Cardiología del Hospital Universitario La Paz, por su colaboración en la inclusión de los pacientes para este estudio y por su asesoramiento para la elaboración de este trabajo.*

*Al Dr. Antoni Andreu, jefe del laboratorio de Enfermedades Neuromusculares y Mitocondriales del Institut de Recerca Vall d'Hebron, así como al Dr. Ramón Martí y la Dra. Elena García-Arumí, agradecer su valiosa colaboración en los análisis de ADN mitocondrial de las muestras de pacientes y en la extracción de las fracciones mitocondriales.*

*Al Dr. Javier Martínez Botas, del servicio de Bioquímica del Hospital Ramón y Cajal, por su ayuda con los arrays de proteínas.*

*A los compañeros de labo Ale, Rubén, Carlos, Ernesto. De todos he aprendido y de todos he recibido ayuda cuando lo he necesitado. Espero haberos correspondido. Gracias a Rubén por los préstamos de los anticuerpos.*

*A todos los compañeros que han pasado por esta nuestra Unidad. Sin vosotros, los buenos momentos en cultivos, en el comedor y hasta en el citómetro, no habrían sido posibles. Y qué decir de esos karaokes, cenas, premios HULP... Gracias por ayudarme y aconsejarme, por los ánimos, por las risas. Gracias a Yolanda, Arancha, Ana, Alicia, Salva, Gema, Virginia, Miguel, Jaime, Vane, Lupe, Luiz, Raquel, Sara, Belén, Águeda, Rosa, Lara, Carol, Rocío...espero que no se ofenda nadie pero si sigo no acabo nunca...Gracias a todos.*

*A mis compañeros del CNIO, por los buenos ratos y por todo lo que aprendí en mi etapa de moscóloga. En especial a Marta y Bego, por la amistad que nos une desde los inicios, incluso ahora desde las antípodas o desde el sunny state. Marta, gracias por las cañas y los animos. Te deseo suerte en tus nuevos proyectos, te mereces eso y más.*

*A Vane, Teresa y María, porque su amistad es lo mejor que me llevo de esta etapa. Gracias por estar ahí, siempre. Por hacer más agradable el día a día. Por hacer que las tardes interminables de los buffys fueran más llevaderas. Por las cañas, menos a menudo de lo que me gustaría. Por escucharme y aconsejarme. Por ser tan geniales y poner un poco de luz en este mundo. Y por mil*

---

# Agradecimientos

---

*motivos más que sería imposible poner en pocas palabras. Os debo tantas cosas que espero poder recompensaros algún día.*

*A mis biólogos, con vuestra amistad hacéis que todo resulte más fácil. Gracias Auro, Carol, Rakel, Lau, Carlix, Nata, Montse, Jan, Maru, Ana por todos los buenos momentos, los viajes, conciertos, las caminatas sin rumbo. Por estar en lo bueno y en lo malo, y por seguir ahí a pesar de estar dispersos por el mundo. Y por ser como sois y hacer que, si volviera atrás en el tiempo, volviera a estudiar biología para poder conoceros.*

*A Ángel, que has estado ahí, día tras día, dándome las fuerzas para seguir adelante, especialmente en los momentos más difíciles. No habría llegado hasta el final sin tu apoyo incansable. Así que ya sabes, una gran parte de esta tesis es tuya. Gracias. Gracias por tantas cosas que aquí no caben y que no se decir.*

*Y sobre todo, gracias a mi familia, sois el pilar fundamental de mi vida. Gracias a mi padre y a mi hermana, por el enorme apoyo y por estar ahí en todo momento y porque sé que, pase lo que pase, siempre estaréis apoyándome. Gracias por quererme tanto. Y en especial, quiero recordar a mi madre, a ella le dedico esta Tesis. Aunque no me has podido acompañar durante esta etapa, tu ejemplo y tu recuerdo me han servido y me servirán de guía para siempre.*

---

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN EN INGLÉS.....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Síndrome Coronario Agudo. ....</b>	<b>11</b>
1.1.1. Características clínicas. ....	11
1.1.2. Cardiopatía isquémica.....	12
1.1.3. Causas de cardiopatía isquémica. ....	12
A. Aterosclerosis. ....	12
B. Disfunción Endotelial. ....	14
1.1.4. Efectos de la isquemia. ....	15
1.1.5. Papel del Sistema Inmune en la patogénesis del SCA. ....	15
<b>1.2. Sistema Inmune Innato. ....</b>	<b>17</b>
1.2.1. Monocitos y Macrófagos. ....	18
1.2.2. Receptores tipo Toll (TLRs).....	20
1.2.3. Señalización asociada a TLR4. ....	21
<b>1.3. Teoría del peligro. ....</b>	<b>23</b>
1.3.1. DAMPs derivados de mitocondrias. ....	25
<b>1.4. Tolerancia a endotoxinas.....</b>	<b>26</b>
1.4.1. Fenómenos de tolerancia cruzada. ....	29
1.4.2. Implicaciones clínicas de la tolerancia. ....	29
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Reactivos.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2. Pacientes.....</b>	<b>37</b>
3.2.1. Estudio de seguimiento.....	39
<b>3.3. Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica. ....</b>	<b>39</b>
<b>3.4. Determinación de la concentración de ADN mitocondrial en las muestras clínicas.....</b>	<b>40</b>
<b>3.5. Aislamiento de la fracción mitocondrial.....</b>	<b>40</b>
<b>3.6. Preparación de los lisados mitocondriales y el ADN nuclear y mitocondrial. ....</b>	<b>41</b>
<b>3.7. Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc.....</b>	<b>42</b>



3.8. PCR a tiempo real. ....	43
3.9. Cytometric Bead Array (CBA). ....	44
3.10. Análisis por citometría de flujo. ....	44
3.11. Análisis por Western Blot. ....	44
3.13. Array de anticuerpos. ....	46
3.14. Arrays de expresión génica. ....	46
3.14.1. Amplificación y marcaje del ARN. ....	46
3.14.2. Protocolo de Hibridación, Lavado, Escáner y Análisis de imágenes. ....	46
3.14.3 Análisis de los arrays de expresión génica. ....	47
3.14.3.1 Análisis estadísticos. ....	47
3.14.4. Análisis del perfil de expresión génica con Ingenuity Pathway Analysis®. ....	48
3.15. Tratamientos. ....	49
3.16. Cultivos mixtos de Mφ y linfocitos T CD4. ....	50
3.17. Índice M1/M2. ....	50
3.18. Análisis estadístico. ....	51
<b>4. RESULTADOS</b> .....	53
4.1. Características clínicas de los pacientes de SCA reclutados para el estudio. ....	55
4.2 Genes con expresión diferencial en las CMSP entre los pacientes de AI y de SCACEST. ....	57
4.3. Efectos adversos de los genes expresados diferencialmente en las CMSP de los pacientes de SCACEST. ....	60
4.4. Análisis funcional de los genes diferencialmente regulados en las CMSP de SCACEST comparado con AI. ....	61
4.4.1. Alteraciones post-IAM en la función y el desarrollo del sistema cardiovascular. ....	67
4.4.2. Evidencia de la inflamación post-IAM en el análisis funcional de expresión génica. ....	70
4.5. El perfil anti-inflamatorio de los Monocitos de sangre periférica correlaciona con la severidad de los pacientes con SCA. ....	73
4.6. El nivel de ADN mitocondrial en suero es mayor en aquellos pacientes con mayor daño tisular. ....	77
4.7. La exposición prolongada de los Mφ al ADN mitocondrial induce una respuesta M2. ....	79

4.8. La exposición al conjunto de DAMPs mitocondriales induce una tolerancia a endotoxina más acusada.....	85
4.9. El lisado mitocondrial induce tolerancia cruzada parcial a TLR2, pero no a TLR3.....	89
4.10. Los Mφ expuestos a lisado mitocondrial afectan la respuesta de linfocitos T CD4. ....	94
4.11. Los pacientes con SCA que presentan monocitos de sangre periférica con fenotipo M2 tienen una tasa mayor de infecciones posteriores. ....	96
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>99</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>117</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>121</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>145</b>



**AHA:** Asociación Americana del Corazón  
**AI:** Angina Inestable  
**CBA:** Cytometric Bead Array  
**CCL:** Chemokine (C-C motif) Ligand  
**CI:** Cardiopatía Isquémica  
**CK-MB:** Creatinquinasa miocárdica  
**CMSP:** Células Mononucleares de Sangre Periférica  
**cTnl:** Troponina I  
**CXCL:** Chemokine (C-X-C motif) Ligand  
**DAMP:** Danger Associated Molecular Pattern  
**EAC:** Enfermedad de las Arterias Coronarias  
**ECG:** Electrocardiograma  
**ESC:** Sociedad Europea de Cardiología  
**HA:** ácido hialurónico  
**IAM:** Infarto Agudo de Miocardio  
**ICP:** Intervención Coronaria Percutánea  
**IL:** Interleuquina  
**IMF:** Intensidad Media de Fluorescencia  
**IQR:** Interquartile Range (Rango Intercuartil)  
**IRAK:** Interleukin-1 Receptor Associated Kinases  
**LBP:** LPS-Binding Protein  
**LPS:** Lipopolisacárido  
**M ± DE:** Media ± Desviación Estandar  
**Mφ:** Monocitos/Macrófagos  
**MHC:** Major Histocompatibility Complex  
**MMP:** Matrix Metalloproteases (Metaloproteasas de la Matriz)  
**MyD88:** Myeolid Differentiation 88  
**NF-κB:** Nuclear Factor-κB  
**NT-proBNP:** fracción amino terminal del Péptido Natriurético Cerebral  
**PAMP:** Pathogen-Associated Molecular Pattern  
**PBS:** Phosphate Buffered Saline  
**PCR:** proteína C reactiva  
**qPCR:** PCR cuantitativa  
**SCA:** Síndrome Coronario Agudo  
**SCACEST:** Síndrome Coronario Agudo con Elevación del ST  
**SCASEST:** Síndrome Coronario Agudo sin Elevación del ST  
**SFB:** Suero Fetal Bovino  
**SRIS:** Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica  
**TIMI:** Thrombolysis In Myocardial Infarction  
**TLR:** Toll-Like Receptor  
**VS:** Voluntarios Sanos

---



The immune system contributes to the development and progression of Acute Coronary Syndromes (ACS) and thus, the functional behavior of immune cells is of great interest in this context. However, little is known regarding the potential counterbalancing role of anti-inflammatory responses. Here, we report that peripheral blood mononuclear cells from STEMI patients show a gene expression profile 24-36h after MI that supports a shift to a negative regulation of lymphocytes, macrophages and neutrophils compared with patients with no MI (unstable angina (UA)). We also found that M $\phi$  from STEMI and NSTEMI patients showed an anti-inflammatory M2 phenotype 24-36h after MI compared with UA and healthy volunteers (HV). On the other hand, depending on the activation potential of the M $\phi$ , LPS stimulation can induce an M1 or M2 response. In this context, not only M $\phi$  from MI patients were shifted towards the M2 activation, but also 27 out of 45 patients (STEMI and NSTEMI) showed M $\phi$  endotoxin tolerance after LPS stimulation, whereas none of the 30 patients with UA showed this state.

In most of the cases, the endotoxin tolerance has been associated to a previous contact with the endotoxin, which induces a refractory state to a second endotoxin challenge. However, in our cohort of patients there were no previous infections which could account for the observed tolerant state. On the other hand, endogenous ligands released by damaged tissues are known to activate TLR signaling as well as induce endotoxin tolerance-like features. Indeed, we found that levels of serum mitochondrial DNA (mtDNA) were significantly higher in STEMI patients, the patients with higher tissue damage. Interestingly, the endotoxin tolerance is more profound in STEMI than in NSTEMI patients. In this context, mitochondrial antigens such as mtDNA, induce M $\phi$ -mediated responses and, therefore, could be implicated in the generation of endotoxin tolerance observed in these patients. Indeed, we found that exposition of human M $\phi$  to mtDNA or whole mitochondrial lysates induced endotoxin tolerance *in vitro*. This cross-tolerance to TLR4 was characterized by a decreased production of pro-inflammatory cytokines, increased production of anti-inflammatory factors, increased frequency of the M2-marker CD163, significant over-expression of IRAK-M and lower levels of antigen presenting molecules after LPS stimulation. Furthermore, mitochondrial DAMPs also induced a partial cross-tolerance to TLR2, whereas signaling through TLR3 was not affected.

As M $\phi$  play a crucial role in the inflammatory response and the subsequent state of tolerance, these endogenous ligands may contribute to clinical complications in ACS. Furthermore, the incidence of endotoxin tolerance is associated with a higher risk of secondary infections. In this context, 7 out of the 45 patients with MI (4 STEMI and 3 NSTEMI) reported an infection in the next three months after the coronary episode. The higher rate of infection correlated with the endotoxin tolerance in M $\phi$  from MI patients.



# **1. INTRODUCCIÓN**





## 1.1. Síndrome Coronario Agudo.

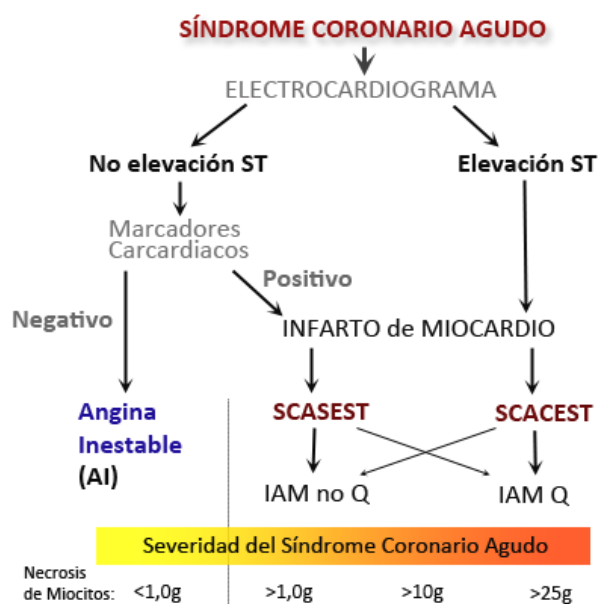
El síndrome coronario agudo (SCA) comprende un conjunto de entidades producidas por la isquemia aguda del miocardio, que incluyen la angina inestable (AI), si la isquemia no llega a provocar necrosis en el tejido miocárdico; el infarto agudo de miocardio (IAM), cuando la isquemia produce necrosis en una parte del miocardio; y la muerte súbita, cuando los impulsos eléctricos del corazón se alteran (taquicardia y/o fibrilación ventricular) provocando el paro cardíaco.<sup>11, 87</sup> Esta isquemia del miocardio en la mayoría de los casos se produce por la erosión o rotura de una placa aterosclerótica que provoca la oclusión de una arteria coronaria por la formación de un trombo.<sup>220</sup>

### 1.1.1. Características clínicas.

La duración de la isquemia causada por el trombo y la vasoconstricción dinámica asociada es lo que determinará el cuadro clínico del SCA. Los resultados del electrocardiograma (ECG) permiten clasificar el SCA en función de si hay o no elevación del segmento ST. La elevación del segmento ST del ECG indica que se trata de un infarto agudo de miocardio (IAM), mientras que el segmento ST sin elevación puede deberse a un IAM o bien a AI (Figura I1).<sup>11, 13</sup>

En la mayoría de los pacientes de SCA el trombo es parcialmente oclusivo u oclusivo sólo transitoriamente, por lo que resulta en isquemia coronaria sin elevación del segmento ST (AI y SCASEST). El AI y SCASEST se diferencian principalmente por la severidad, en función de si la isquemia se prolonga el tiempo suficiente para provocar daños en la estructura del miocardio y la liberación de marcadores de necrosis miocárdica (Figura I1). Los marcadores más comunes son la troponina I (TnI), la troponina T (TnT) o la CK-MB (isoforma de la enzima Creatinquinasa

**Figura I1. Esquema de la clasificación clínica de los Síndromes Coronarios Agudos y espectro de la severidad y de la necrosis de miocitos asociada a cada grupo de SCA.<sup>94</sup>** EL SCA varía desde la Angina inestable (AI), en la que no se detecta necrosis de miocitos, hasta el infarto agudo de miocardio (IAM). La AI se caracteriza por ausencia de marcadores cardíacos y no presenta elevación del ST en el electrocardiograma. En el IAM, los marcadores cardíacos están aumentados en proporción al grado de necrosis de miocitos y se subdividen por la elevación del ST (SCASEST) o sin elevación del ST (SCASEST).



específica de miocardio).<sup>11, 13, 16</sup> En la AI la isquemia no es severa ni prolongada (normalmente menos de 20 minutos) y se produce en reposo. En el SCASEST la interrupción dura más tiempo (normalmente 1-2h), aunque el miocardio puede estar protegido por circulación colateral desde otros vasos, lo que reduce la isquemia y la necrosis del tejido miocárdico.<sup>11, 13</sup>

En el IAM con elevación del segmento ST (SCACEST) el trombo intracoronario ocluye completamente el vaso y no hay circulación colateral, la duración de la isquemia es más prolongada y el alcance de la necrosis es mayor. La mayoría de los pacientes que presentan esta elevación del segmento ST manifiestan luego ondas Q de necrosis pronunciadas en el ECG y terminan por ser diagnosticados de infarto de miocardio con persistencia de la onda Q (Figura I1).<sup>11, 13</sup> Así, el SCACEST es el SCA de mayor severidad y en el que se presenta una mayor necrosis miocárdica (Figura I1).

### **1.1.2. Cardiopatía isquémica.**

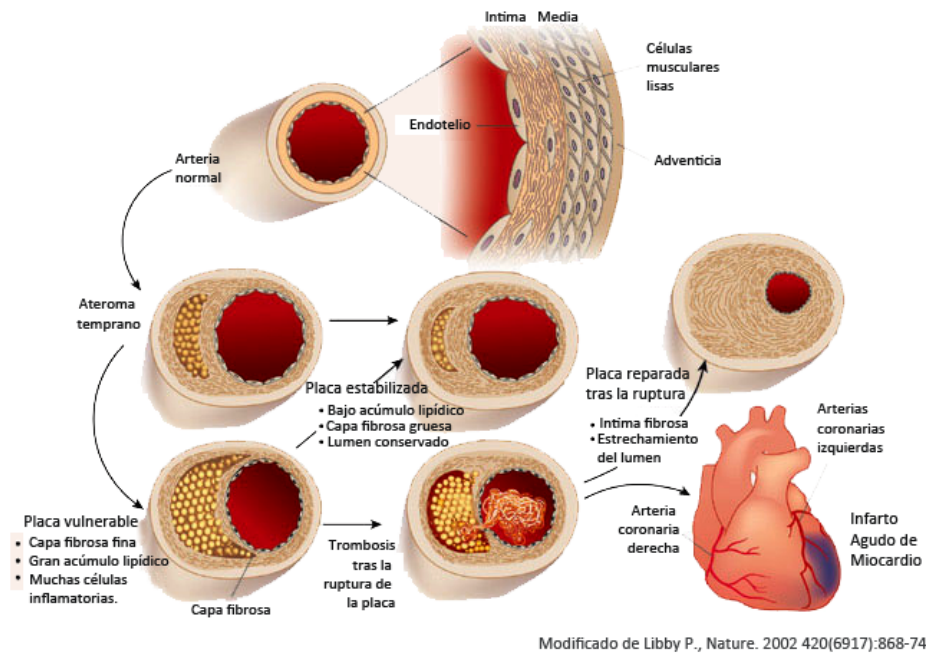
La isquemia cardíaca se define como la situación en la que el corazón recibe un aporte sanguíneo inadecuado para mantener sus funciones esenciales, con la consecuente carencia de oxígeno. Los SCA son los principales responsables de la mortalidad por cardiopatía isquémica, de manera directa o indirecta. La cardiopatía isquémica constituye un problema sanitario importante en los países occidentales. Según la OMS, en 2008 las cardiopatías isquémicas ocupaban el primer lugar entre las causas de muerte a nivel mundial.

### **1.1.3. Causas de cardiopatía isquémica.**

Existen numerosas causas de isquemia miocárdica, pero la más frecuente es la aterosclerosis coronaria. Otra causa de gran importancia es la disfunción endotelial que produce el vasoespasmo coronario. Causas menos comunes de isquemia miocárdica incluyen la inflamación de las arterias coronarias con trombosis, la anemia severa y la hipotensión severa.

#### **A. Aterosclerosis.**

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por el estrechamiento progresivo de las arterias. Este estrechamiento se produce por engrosamientos focales asimétricos en la capa íntima de la pared arterial que disminuyen la elasticidad de los vasos denominados placas ateroscleróticas (Figura I2).<sup>121</sup> Es un proceso patológico de origen multifactorial que, esencialmente, está compuesta por dos fenómenos interrelacionados: la aterogénesis, que consiste en una acumulación focal de lípidos intra y extracelulares, formación de células espumosas y reacción inflamatoria; y la esclerosis, en la que se produce



**Figura I2.**  
Esquema del proceso de formación y desarrollo de la placa de ateroma, desde las primeras etapas hasta la posibilidad de estabilización o bien desestabilización y, en este caso, la trombosis.

el endurecimiento cicatricial de la pared arterial caracterizado por el aumento del número de miocitos, distrofia de la matriz extracelular, calcificación, necrosis e infiltración inflamatoria.<sup>289</sup>

Las placas ateroscleróticas están constituidas por células inflamatorias, células musculares lisas, elementos del tejido conectivo, lípidos y depósitos de calcio.<sup>121, 265</sup> Todos los aspectos de la formación de la placa y de la progresión de la aterosclerosis están asociados a respuestas inflamatorias.<sup>265</sup> La aterosclerosis comienza con el daño en el endotelio, causado típicamente por hiperlipidemia, hipertensión arterial, diabetes o tabaquismo y ocurre preferencialmente en zonas determinadas del árbol arterial, como son los puntos de ramificación de la arteria coronaria.<sup>258, 319</sup> Una vez que hay disfunción endotelial, ocurren dos fenómenos concurrentes: cuando existe una concentración elevada en el plasma de lipoproteínas aterogénicas, principalmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL), se produce el depósito de colesterol en el espacio subendotelial, donde las LDL son modificadas mediante oxidación (oxLDL) por las especies reactivas de oxígeno.<sup>291</sup> Este depósito induce en las células endoteliales la expresión de moléculas de adhesión (selectinas e integrinas) y de factores quimiotácticos, como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), capaz de atraer diversas células inflamatorias, como monocitos, linfocitos T y células dendríticas.<sup>265, 281</sup> Aunque inicialmente se trata de un mecanismo de defensa del endotelio, finalmente contribuye a la generación y el desarrollo de la lesión ateromatosa.

Entre las células inflamatorias, los monocitos son los primeros en ser atraídos por las quimioquinas, migran a la íntima y se diferencian a macrófagos en respuesta al factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y al oxLDL.<sup>175</sup> Este proceso de diferenciación incluye un

incremento en la expresión de receptores para las oxLDL, mediante los cuales captan el oxLDL y desechos de células apoptóticas ricas en colesterol. De este modo, los macrófagos se cargan de lípidos, transformándose en células espumosas que, finalmente, mueren vertiendo su contenido lipídico en el tejido subendotelial.<sup>175, 265</sup>

La evolución de la lesión implica la migración de células musculares lisas a la zona, donde depositan proteínas de la matriz extracelular (fundamentalmente colágeno) formando una cubierta fibrosa protectora sobre la lesión (Figura I2).<sup>264</sup> Las placas ateroscleróticas estables pueden complicarse por la ruptura de esta cubierta fibrosa. Una de las causas de rotura es la degradación que se produce por la secreción de metaloproteasas de la matriz (MMPs) por los macrófagos.<sup>104, 276</sup> La exposición del núcleo lipídico de la placa desestabilizada es altamente trombogénico ya que es rico en factor tisular (proteína que activa la vía extrínseca de la cascada de coagulación). De este modo se desencadenará la trombosis, favorecida por la disfunción del endotelio vascular que habrá perdido su capacidad anti-trombótica,<sup>14</sup> causando oclusiones vasculares agudas<sup>85</sup> (Figura I2). Si esto sucede en la circulación coronaria resulta en la manifestación de un SCA.<sup>19, 102, 328</sup> Existen varios factores de riesgo que favorecen la rotura de la placa y la aparición del SCA, como la elevación de los niveles plasmáticos del colesterol asociado a las proteínas LDL, el descenso de los niveles plasmáticos del colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL), el tabaquismo, la hipertensión o la hiperglucemia.<sup>327</sup>

## **B. Disfunción Endotelial.**

El aumento de la permeabilidad, controlado principalmente por la estabilidad de las uniones endoteliales, es un suceso temprano en el deterioro de la integridad vascular en los trastornos isquémicos.<sup>34, 111</sup> El endotelio regula el tono vascular, la actividad de las plaquetas, la adhesión de leucocitos y la angiogénesis mediante la producción de óxido nítrico y otros factores reguladores.<sup>25</sup> Sin embargo, cuando hay factores de riesgo coronario puede ocurrir una disfunción endotelial, caracterizada por la reducción de las funciones de vasodilatación, aumento de la vasoconstricción y por una actividad inflamatoria y pro-trombótica crónica, lo que produce un daño en la pared arterial.<sup>172</sup> Estos factores de riesgo, tales como hipoxia, exposición a citoquinas, endotoxinas, colesterol y estrés hemodinámico, activan las células endoteliales potenciando la vasoconstricción, la coagulación, la adhesión de leucocitos y la proliferación de células musculares lisas, lo que favorece la aterosclerosis.<sup>11, 12</sup>

Además del papel en la aterosclerosis, la disfunción endotelial promueve la vasoconstricción patológica en respuesta a situaciones que provocan isquemia, como el estrés físico o emocional, causando una oclusión parcial o total de la arteria, con una consecuente isquemia tisular.<sup>334</sup>

## 1.1.4. Efectos de la isquemia.

Después de un episodio isquémico, el tejido miocárdico puede recuperarse si se restaura el flujo sanguíneo en un intervalo de 15 a 20 minutos. Esta reperfusión miocárdica, ya sea espontánea o terapéutica, propicia la llegada de sangre y nutrientes, con lo que limita la extensión del IAM. Sin embargo, a pesar de sus claros beneficios, la reperfusión miocárdica exacerba el daño celular<sup>333</sup> ya que induce la liberación de radicales libres de oxígeno, inflamación y disfunción microvascular, situaciones que pueden condicionar un daño funcional y estructural en el miocardio.<sup>217</sup> Por otro lado, si la duración de la isquemia es mayor, se produce necrosis causando un aumento en el estrés mecánico de la pared, lo que desencadena un mecanismo compensatorio denominado remodelación cardíaca.<sup>235, 249</sup> Durante la remodelación se producen cambios en el tamaño, en la forma y en la función del corazón, regulados por factores mecánicos, neurohormonales (como la activación del sistema renina-angiotensina) y genéticos.<sup>249, 266</sup> Entre estas respuestas adaptativas se encuentran la dilatación de la cámara del corazón, la hipertrofia y la apoptosis de los cardiomiocitos o cambios en la composición y distribución de los componentes de la matriz extracelular, principalmente el colágeno, generando la fibrosis que se extiende hasta la región no infartada.

La remodelación post-IM se ha dividido en una etapa temprana (primeras 72h) y una etapa tardía (después de las 72h). La fase inicial conlleva la reparación de la zona necrosada y la expansión de la zona de infarto. En este punto, la cicatrización del miocardio puede considerarse hasta cierto punto beneficiosa, ya que mejora o mantiene la función del corazón. Sin embargo, en las etapas tardías de la remodelación, las zonas no infartadas experimentan una progresiva hipertrofia de miocitos y fibrosis intersticial, con lo que se aumenta la masa ventricular y el volumen, afectando negativamente a la función del corazón y pudiendo derivar en insuficiencia cardíaca.<sup>50</sup> De esta manera, el proceso de remodelación iniciado como una respuesta compensatoria al daño y al estrés mecánico, se convierte lentamente en un proceso que conduce a la disfunción ventricular progresiva.<sup>235</sup> Así, la remodelación cardíaca está unida a la progresión hacia el fallo cardíaco y se asocia a una peor prognosis en los pacientes que sobreviven a un IM.<sup>322</sup>

## 1.1.5. Papel del Sistema Inmune en la patogénesis del SCA.

Hay cada vez más evidencias que apoyan el papel patogénico de la inflamación en el SCA.<sup>158, 223, 312</sup> Las células del sistema inmune tienen protagonismo en el desarrollo de la placa aterosclerótica, ya que son predominantes en las lesiones ateroscleróticas tempranas y sus moléculas efectoras aceleran la progresión de la lesión.<sup>121</sup> Además, se ha demostrado que la

inflamación es esencial en la rotura de la placa.<sup>312</sup> Así, se ha observado que las placas inestables presentan mayor infiltración de macrófagos, linfocitos T y células musculares lisas activadas que las estables.<sup>265, 312</sup> Además, estos procesos inflamatorios locales pueden liberar citoquinas y otros reactantes inflamatorios de fase aguda a la circulación.<sup>178, 63, 64</sup> Estos niveles elevados de marcadores bioquímicos inflamatorios se han asociado a un aumento del riesgo de eventos cardíacos adversos graves en pacientes de SCA,<sup>177, 178</sup> pudiendo causar síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), una manifestación clínica de inflamación sistémica que se produce en numerosas condiciones como en infecciones.<sup>52, 173</sup> En este contexto, hay evidencias de que procesos inflamatorios independientes, a parte de la inflamación local, podrían estar implicados en la patogénesis del SCA.<sup>300</sup>

Por otro lado, el sistema inmune no sólo está implicado en el desarrollo del SCA, sino también en la resolución del episodio coronario. Prácticamente todos los aspectos de la remodelación ventricular, incluyendo la formación de tejido cicatricial, la hipertrofia y apoptosis de los cardiomiocitos, la degradación de la matriz intersticial, el depósito de colágeno y la dilatación de la cámara ventricular, han sido asociados a la respuesta inflamatoria.<sup>96</sup> Después del daño isquémico, determinados productos resultantes de la necrosis del miocardio son liberados, iniciando la respuesta inmune innata al activar vías de señalización como los TLRs (Toll like Receptors) o el complemento, de modo que las células inflamatorias son atraídas a la zona dañada del miocardio.<sup>245</sup> Debido a esta activación del sistema inmune innato, durante varias horas se sobre-expresan citoquinas y quimioquinas que atraen a las células inflamatorias, incluyendo neutrófilos y macrófagos, hacia la zona infartada del corazón.

Dentro del conjunto del sistema inmune, los monocitos/macrófagos (M $\phi$ ) desempeñan una función esencial en todas las fases del SCA, desde el inicio de la lesión aterosclerótica hasta la posible rotura de la placa<sup>237</sup> y el desencadenamiento del IAM. Así, se ha comprobado que existe una mayor presencia de macrófagos en las placas responsables de un SCA y que los macrófagos son las células de respuesta más importantes en la reparación del corazón tras el IAM.<sup>85</sup> La activación de vías inflamatorias por el IAM induce la rápida infiltración de M $\phi$  en el miocardio infartado, debido a mediadores quimiotácticos como el CCL2 o el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Los macrófagos infiltrados desempeñan múltiples funciones en el corazón infartado. Por un lado, son responsables de la eliminación de desechos y de los cardiomiocitos necróticos y los neutrófilos apoptóticos. Son así mismo fuente de citoquinas y factores de crecimiento que regulan el crecimiento de fibroblastos y la angiogénesis.<sup>227</sup> Por último, contribuyen a la remodelación de la matriz extracelular con la producción de MMPs y sus inhibidores.<sup>227</sup>

Hay cada vez más evidencias que sugieren que defectos en las vías que regulan la supresión, resolución y la contención de la respuesta inflamatoria después del infarto, tienen como resultado una remodelación adversa del corazón infartado.<sup>75, 132, 149</sup> Una inflamación temprana excesiva puede aumentar la degradación de la matriz causando la ruptura cardíaca. La prolongación de la inflamación puede entorpecer el depósito de colágeno dando lugar a la formación de una cicatriz que reduce la resistencia de tracción, aumentando así la dilatación de la cámara. El aumento excesivo de mediadores pro-inflamatorios puede activar vías pro-apoptóticas induciendo una mayor pérdida de cardiomiocitos. Finalmente, el fallo en la contención de la reacción inflamatoria puede extender la infiltración de células inflamatorias a zonas no infartadas, aumentando la fibrosis y empeorando la función sistólica. Por otro lado, las terapias inmunosupresoras con corticosteroides resultaron en un aumento de incidentes fatales, como la ruptura cardíaca,<sup>120, 261</sup> lo que sugiere que una respuesta inmune controlada es un prerrequisito para una reparación cardíaca adecuada después del IM. En este contexto, el perfil inflamatorio de los macrófagos infiltrados debe ir cambiando a lo largo del proceso de reparación. Así, después de una primera fase pro-inflamatoria se debe inhibir la síntesis de quimioquinas y citoquinas para prevenir el exceso de inflamación. Al mismo tiempo, se debe dar un cambio desde la respuesta de fagocitosis y eliminación de desechos hacia un fenotipo que promueva la reparación del tejido y la cicatrización.<sup>225</sup>

Por tanto, a pesar de que los macrófagos no son fácilmente accesibles en la placa aterosclerótica coronaria en humanos, es posible centrarse en sus precursores, los monocitos de sangre periférica. Estas células están expuestas al mismo ambiente fisiopatológico que el lumen vascular, por lo que pueden servir de sensores del daño en los vasos. Además, el tipo de respuesta inflamatoria que exhiben los macrófagos en la lesión podría ser ya patente en sus precursores circulantes. Por otro lado, determinadas poblaciones de células espumosas parecen ser capaces de migrar desde las placas ateroscleróticas hasta el torrente sanguíneo.<sup>108, 244</sup> Por consiguiente, el análisis del perfil inflamatorio de los monocitos de sangre periférica podría mejorar nuestros conocimientos sobre el papel de los macrófagos en el proceso aterosclerótico así como su correlación con los distintos estadios clínicos del SCA.

## 1.2. Sistema Inmune Innato.

El sistema inmunitario está formado por un conjunto de células, órganos especializados y mecanismos que protegen al organismo de infecciones y agresiones mediante la identificación y eliminación de agentes patógenos o dañinos. Según el tipo de respuesta que predomine, el sistema inmune se divide en inmunidad innata y adaptativa. Ambas respuestas se diferencian



por ejemplo en los mecanismos o los tipos de receptores utilizados para el reconocimiento antigénico o en los tipos celulares efectores.

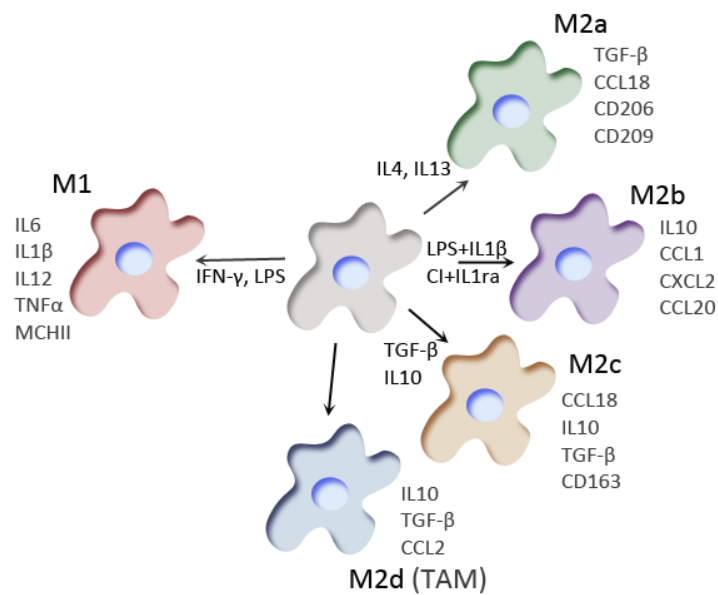
El sistema inmune innato fue descrito por primera vez hace más de un siglo y está presente en todos los microorganismos multicelulares.<sup>321</sup> La inmunidad innata representa la primera barrera defensiva del organismo frente a diferentes agresiones tales como quemaduras, intervenciones quirúrgicas o infecciones, y no requiere sensibilización previa.<sup>279</sup> En este tipo de inmunidad intervienen las barreras físicas y químicas (epitelio y las sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales), proteínas plasmáticas (sistema de complemento, proteínas de fase aguda) y varios tipos celulares como las células NK (Natural Killer), neutrófilos, células dendríticas y los Mφ.<sup>263</sup>

Las células del sistema inmune innato son capaces de reconocer estructuras altamente conservadas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y son las que inician muchas de las respuestas adaptativas.<sup>201</sup> Las células dendríticas y los Mφ internalizan y procesan los antígenos, exponiendo los productos obtenidos a través de las moléculas de MHC de clase II. El complejo MHC-II-antígeno es reconocido por los linfocitos T, iniciando la respuesta adaptativa. El reconocimiento del patógeno por las células dendríticas y los Mφ activa vías de transducción de señales que inducen la liberación de citoquinas como las interleuquinas (IL)-1β, IL6, IL8, IL12 y el factor de necrosis tumoral-α (TNFα). Se induce además la secreción de otras moléculas como la enzima activadora de plasminógeno, radicales de oxígeno, peróxido, factor activador de plaquetas, óxido nítrico y mediadores lipídicos de inflamación (prostaglandinas y leucotrienos).<sup>99</sup> Por tanto, el tipo de activación de la célula presentadora de antígeno es crítica a la hora de determinar el tipo de respuesta. Si la célula presentadora de antígeno secreta IL12 e IL18, se incrementa la función citotóxica de células NK y linfocitos T CD8+,<sup>100, 251, 299</sup> estimulándose la secreción de IFN-γ por células T y NK y el desarrollo de respuestas adaptativas Th1.<sup>251</sup> Si por el contrario se secretan IL4 e IL10, se induce la respuesta Th2 y la síntesis de anticuerpos.<sup>187, 213</sup>

## 1.2.1. Monocitos y Macrófagos.

En la respuesta del sistema inmune innato los macrófagos, los macrófagos tisulares y sus precursores circulantes, los monocitos, juegan un papel clave.<sup>162</sup> Los Mφ participan en la respuesta innata reconociendo al patógeno, actuando como fagocitos e interconectando con el sistema adaptativo como células presentadoras de antígenos.<sup>305</sup>

Los Mφ son una de las poblaciones celulares más dinámicas y heterogéneas del sistema inmune, lo que les permite responder eficientemente a los diferentes microambientes



**Figura I3. Polarización de los macrófagos.**

Dependiendo del microambiente, los macrófagos pueden diferenciarse a distintos fenotipos con características funcionales específicas. CI: complejos inmunes.

tisulares.<sup>214</sup> Los Mφ se clasifican de forma general en dos grupos: M1 y M2 (Figura I3). Los Mφ activados clásicamente o M1 son inducidos por IFN-γ, lipopolisacárido (LPS) o TNFα. Estos Mφ son efectores pro-inflamatorios, capaces de producir grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias como IL12, TNFα, IL6 e IL1β, tienen funciones bactericidas y promueven una respuesta adaptativa Th1.<sup>68, 69</sup> Por el contrario, la activación alternativa o M2, que incluye diferentes fenotipos solapados (M2a, b, c, d), son aquellos Mφ activados de cualquier otra forma que no sea M1, siendo la más común la activación por IL4/IL13 o IL10 (Figura I3).<sup>116, 192</sup> Los Mφ con activación M2 en general se identifican por la producción de factores anti-inflamatorios (ej. IL10, TGF-β, CCL18)<sup>192</sup> y por la expresión del receptor depurador o scavenger CD163.<sup>38, 112, 290, 293</sup> Dependiendo de la sub-clasificación, las células M2 tienen características diferentes. En el caso de la activación M2a y M2b, promueven una respuesta adaptativa Th2, mientras que los M2c están involucrados en la resolución de la inflamación y la reparación del tejido.<sup>68, 69</sup> Por otro lado, los macrófagos M2d, también denominados macrófagos asociados a tumores (TAMs), contribuyen a la tolerancia a tumores.<sup>189</sup>

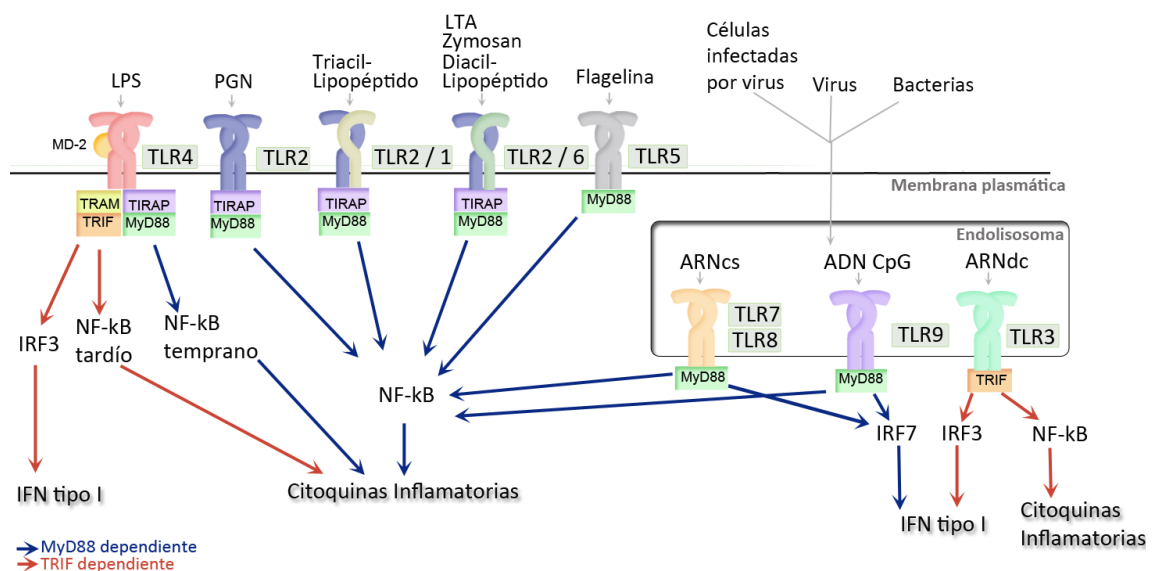
Sin embargo, aunque este modelo clasifica los fenotipos de activación observados, es importante considerar que subestima la complejidad *in vivo*, donde existe una alta diversidad de estados de Mφ activados en respuesta a diferentes estímulos y ambientes, conformando un rango continuo de activación. En este contexto, se han descrito Mφ con fenotipos intermedios o solapantes. Por ejemplo, el análisis del transcriptoma de monocitos infectados con citomegalovirus humano presentan una polarización M1-M2 atípica, con tendencia a M1 pero expresando genes M2 como IL10, CCL18 o CCL22.<sup>58</sup> Del mismo modo, macrófagos del tejido adiposo de ratones obesos tienen un perfil mixto, con sobre-expresión de genes característicos

tanto de M1 como de M2.<sup>278</sup> Por otro lado, se han descrito cambios en el fenotipo de los Mφ durante el curso de diversas patologías como cáncer, sepsis y obesidad.<sup>28, 29, 184</sup> De esta manera, los fenotipos M1 y M2 representan los extremos de un amplio espectro de estados de activación dependiendo de las señales del entorno.<sup>115, 214</sup>

## 1.2.2. Receptores tipo Toll (TLRs).

Hasta que a mediados de la década de los 90 se descubrieron los receptores tipo Toll (TLR) en humanos, se creía que la inmunidad innata reconocía los patógenos de manera no específica.<sup>199, 297</sup> Los receptores Toll se describieron inicialmente en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como moduladores de la polarización dorso-ventral durante el desarrollo embrionario. Posteriormente, se demostró que los Toll eran parte fundamental de la respuesta inmune de la mosca adulta en la defensa frente a infecciones bacterianas y fúngicas.<sup>171</sup> Hasta el momento se han identificado 10 receptores TLR funcionales en humanos que desempeñan un papel crucial en la inmunidad innata.<sup>147</sup> Los TLRs son capaces de identificar a una gran variedad de antígenos ya que reconocen estructuras altamente conservadas o PAMP que son expresadas por diferentes microorganismos, como bacterias, hongos, protozoos y virus.

Los TLRs son proteínas transmembrana tipo I que presentan un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucinas (LRR) formando una estructura cóncava implicada en el



**Figura I4. Reconocimiento de PAMPs por los TLRs.** Tras el reconocimiento del ligando específico, diferentes proteínas adaptadoras median la activación de los factores de transcripción NF-κB o IRF. Todos los TLRs, menos el TLR3, señalizan a través de la proteína adaptadora MyD88 (flechas azules). El TLR3 señaliza por la vía de TRIF (flechas rojas). El TLR4 señaliza por ambas vías, y se ha propuesto que la señalización vía MyD88 se asocia con una actividad en etapas tempranas del factor NF-κB, mientras que la vía de TRIF parece estar relacionada con la actividad transcripcional tardía de NF-κB. PGN: Peptidoglicano.

reconocimiento de patógenos.<sup>8</sup> Poseen un dominio citoplasmático conservado crucial para la señalización denominado TIR (Toll/IL-1R).<sup>85, 86</sup> Los TLR se expresan en un amplio rango de tipos celulares como Mφ y células dendríticas.

Los TLRs responsables de la detección de productos bacterianos y ligandos endógenos (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6) se localizan en la membrana plasmática (Figura I4). Aunque la mayoría de los TLRs funcionan como homodímeros, el TLR2 forma heterodímeros con TLR1 y TLR6, lo que permite reconocer una alta variedad de componentes microbianos como peptidoglicanos (PGN), ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas o zimosan de hongos. Los TLR también dependen para su función de otros co-receptores, como en el caso del TLR4 que requiere de la proteína soluble MD2 para el reconocimiento del LPS de la pared de bacterias Gram negativas. El TLR5 reconoce la flagelina, constituyente de los flagelos bacterianos.<sup>147</sup> Los TLRs que detectan los componentes virales (TLR3, 7, 8 y 9) se localizan intracelularmente en la membrana de los endosomas (Figura I4). El TLR3 reconoce el ARN de doble cadena y productos sintéticos como el ácido poliinosínico:policitidílico (Poly I:C). El TLR7 y TLR8 participan en el reconocimiento de virus a través de ARN de cadena simple. El TLR9 es esencial en la respuesta al ADN bacteriano, reconociendo los motivos CpG sin metilar característicos de los procariotas.<sup>147</sup>

La interacción ligando-receptor desencadena una cascada de señalización en la que intervienen varias proteínas adaptadoras que se pueden clasificar principalmente en dos rutas: vía MyD88-dependiente, común a todos los receptores TLR excepto al TLR3, y la vía MyD88-independiente, propia de TLR3 y de TLR4 (Figura I4).<sup>147</sup>

### 1.2.3. Señalización asociada a TLR4.

De todos los TLRs, el TLR4 es de los primeros miembros de la familia *Toll* que se identificó en mamíferos y el que mejor se ha caracterizado.<sup>199</sup> Este receptor se encuentra expresado en células endoteliales, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas.<sup>147, 202</sup> Se han descrito numerosas patologías asociadas a mutaciones o polimorfismos en este receptor, como la malaria,<sup>205</sup> la susceptibilidad a infección por meningococo<sup>84</sup> o respuestas diferenciales a endotoxemia sistémica,<sup>42</sup> lo que pone de relieve la importancia del TLR4 en la respuesta inmune innata.

El TLR4 se localiza en la membrana plasmática y es esencial para la respuesta frente al LPS, componente principal de la superficie externa de bacterias Gram negativas. El LPS se une a la proteína de unión a LPS (LBP) presente en el plasma y a la proteína CD14 localizada en la superficie de los Mφ y células dendríticas. Tras la interacción del LPS con el TLR4, asociado a su

vez con CD14 y MD-2,<sup>183</sup> se induce el reclutamiento de las moléculas adaptadoras MyD88 y TRIF al dominio intracelular de TLR4 (Figura I4).<sup>7</sup> La proteína MyD88 recluta y activa a IRAK-4 (IL-1R Associated Kinase-4),<sup>295</sup> e IRAK-4 es responsable del posterior reclutamiento y fosforilación de IRAK-1. Esto provoca inestabilidad energética en el complejo iniciador induciendo su disociación de MyD88. A continuación, IRAK-1 e IRAK-4 interactúan con la molécula adaptadora TRAF-6 (TNF Receptor-Associated Factor-6), dando lugar a la activación de dos tipos de cascadas de señalización: la del complejo de quinasas inhibidor de IκB (IKK), que termina en la activación de NF-κB, y la vía de las MAPKs. Por un lado, las MAPKs pueden activar la vía del factor de transcripción AP-1 (Activation Protein-1) mediante la activación de ERK1/2 (Elk-Related Tyrosine Kinase).

Por otro lado, los distintos miembros de la familia NF-κB (p65/RelA, p50, c-Rel, RelB y p52) pueden combinarse entre ellos formando homo o heterodímeros cuya capacidad transcripcional varía según la composición de los complejos.<sup>128</sup> En la señalización canónica de NF-κB participan los heterodímeros p65/p50, que en células no estimuladas se encuentran secuestrados en el citoplasma formando un complejo con la familia de proteínas inhibidoras IκB (IκBα, β, ε).<sup>128</sup> Tras el estímulo inflamatorio, la activación del complejo IKK conduce, por mecanismos de fosforilación y ubiquitinación, a la degradación de las IκB en el proteasoma. Los heterodímeros p65/p50 libres se translocan al núcleo e inducen la transcripción de genes inflamatorios, tales como TNFα, IL1β, IL6, IL12.<sup>147,87</sup>

En la vía MyD88-independiente, la señalización a través de TRIF además de activar la transcripción de genes mediada por NF-κB, conduce a la activación de los factores de transcripción IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) y STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1), los cuales a su vez inducen la expresión de IFN-β y de genes inducibles por interferón como las quimioquinas CCL5 y CXCL10, IRF-1, IP-10 o VCAM-1. Esta vía se descubrió observando que el LPS era capaz de provocar una respuesta en ratones deficientes en MyD88 aunque más lenta comparada con la respuesta en ratones normales.<sup>146, 304</sup>

Ambas vías parecen estar interconectadas. Se ha propuesto que, al estimular con LPS, la señalización vía TLR4/MyD88 se asocia con una activación temprana del factor NFκB y de la vía de las MAPKs, mientras que la vía TLR4/TRIF parece estar relacionada con la actividad transcripcional tardía de NFκB y MAPKs.<sup>330</sup>

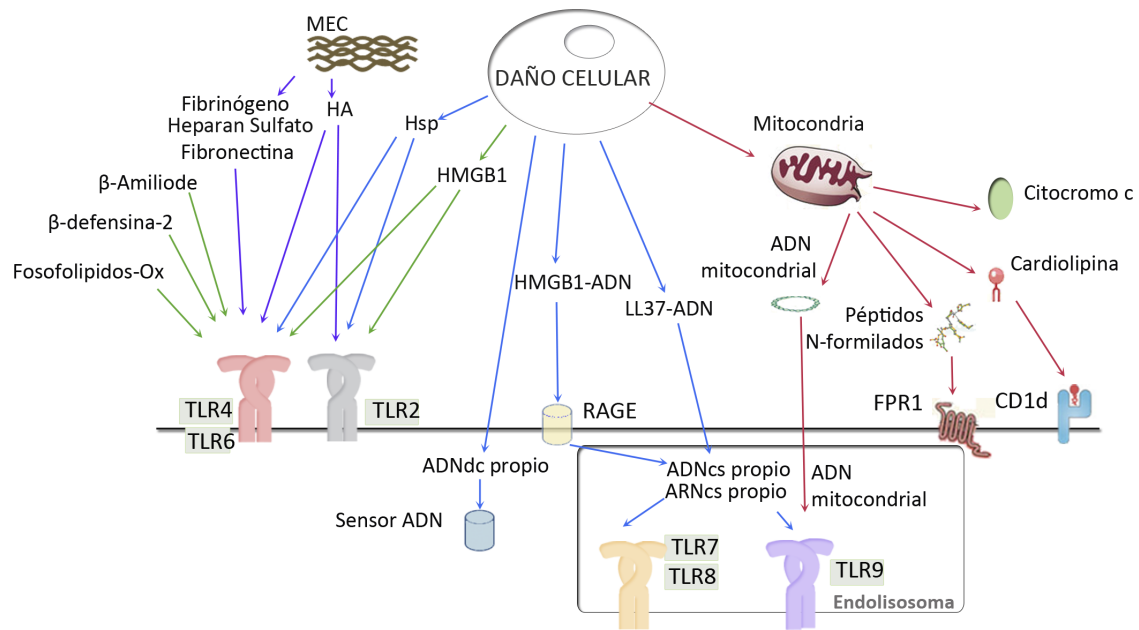
Además del reconocimiento del LPS, el receptor TLR4 también se ha implicado en el reconocimiento de otros ligandos como el taxol o ligandos endógenos como las proteínas de choque térmico HSP60 y HSP70,<sup>236</sup> el fibrinógeno,<sup>282</sup> el ácido hialurónico (HA),<sup>273</sup> la fibronectina<sup>114</sup>

y las  $\beta$ -defensinas.<sup>147</sup> Este fenómeno ha hecho pensar en su posible implicación en el desarrollo de tolerancia periférica y procesos autoinmunes.<sup>79</sup>

### 1.3. Teoría del peligro.

Tradicionalmente se creía que el sistema inmune sólo era capaz de discriminar entre lo propio y no-propio y activar la inmunidad innata en respuesta a las bacterias y otros patógenos. Sin embargo, aunque este modelo es válido para explicar la activación inmune y la inflamación producida por patógenos o por el rechazo a los trasplantes, falla a la hora de explicar la inflamación que ocurre en el trauma o la autoinmunidad, en los cuales no hay agentes extraños. Para resolver este vacío, en 1994 Polly Matzinger propuso la «teoría del peligro», según la cual el sistema inmune es capaz de discriminar entre lo propio y no-propio y, además, distinguir señales de alarma o peligro liberadas por los tejidos lesionados, como aquellos expuestos a patógenos, toxinas, daño mecánico y muerte por necrosis.<sup>195</sup> Según este modelo, la iniciación de la respuesta inflamatoria ocurre tanto en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos como a determinados componentes celulares que se liberarían de las células dañadas, tanto durante las infecciones, como durante procesos estériles.<sup>196</sup>

La teoría del peligro ha sido respaldada por el hallazgo de multitud de señales de alarma endógenas. En el año 2000 se publicó el primer artículo sobre una señal endógena de peligro, la proteína de choque térmico HSP60, que inducía una respuesta pro-inflamatoria mediada por el TLR4.<sup>233</sup> Posteriormente se han descrito otras como el ADN, el ARN, proteínas de choque térmico, el interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), o el HA. Estos hallazgos indican que el sistema inmune innato posee mecanismos capaces de identificar el daño celular al detectar la presencia de un conjunto de moléculas que sólo se exponen como consecuencia de la muerte celular. Estos ligandos endógenos se han denominado patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs del inglés Danger Associated Molecular Patterns).<sup>275</sup> En condiciones normales, estos ligandos endógenos y sus receptores están localizados en diferentes compartimentos celulares de forma que no puedan interactuar entre sí, permaneciendo de este modo invisibles al sistema inmune. Sin embargo, en condiciones patológicas los DAMPs son liberados de los tejidos dañados, bien de forma pasiva como sucede en las células necróticas, o bien activamente mediante su secreción o exposición en la capa externa de la membrana celular en aquellas células que presentan daños. Los DAMPs también se originan por la degradación de la matriz extracelular (ej, HA, heparan sulfato). Por otro lado, se ha descrito que incluso las células apoptóticas, como los condrocitos hipertróficos, pueden liberar ligandos endógenos de los TLRs.<sup>301</sup>



**Figura 15. DAMPs endógenos.** Se han descrito numerosas moléculas endógenas capaces de actuar como DAMPs. Son liberadas por el daño celular (flechas azules), activamente por células en condiciones de estrés (flechas verdes) o por daño en la matriz extracelular (flechas moradas). Recientemente, la mitocondria está emergiendo como una fuente de numerosos DAMPs (flechas rojas).

A pesar de que ha habido importantes avances en nuestra comprensión de cómo los patógenos desencadenan la inflamación, se conoce mucho menos acerca de este proceso en situaciones estériles. El conjunto de los DAMPs endógenos es estructuralmente muy diverso y, sin embargo, hay cada vez más evidencias de que el sistema inmune innato puede reconocerlos de manera similar y estimular la respuesta inflamatoria estéril a través de vías comunes. Los DAMPs endógenos tienen la capacidad de afectar la función de las células del sistema inmune innato, como células presentadoras de antígeno (células dendríticas y Mφ),<sup>106</sup> eosinófilos<sup>154, 181, 270</sup> y neutrófilos,<sup>339</sup> alterando su maduración, su estado de activación o su capacidad presentadora de antígenos. Cabe destacar que los DAMPs son capaces de estimular a los Mφ en ratones deficientes en linfocitos, lo que confirma que este proceso no depende de la respuesta adaptativa.<sup>156</sup>

Los DAMPs son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) tanto en membrana como en citoplasma, como los TLRs, los receptores tipo NOD (NLRs), los receptores tipo RIG-I (RLRs) y los receptores purinérgicos.<sup>8, 238</sup> En muchos casos son los mismos receptores que reconocen los PAMPs, lo que apoya la observación de que las respuestas inflamatorias estériles son semejantes a las respuestas que se dan durante una infección, con un perfil de producción de citoquinas y quimioquinas similar.<sup>147, 207, 262</sup> Una vez activados, los PRRs desencadenan vías de

señalización específicas, de las cuales las mejor estudiadas son las vías pro-inflamatorias que activan NF- $\kappa$ B en respuesta a la mayoría de los TLRs, a NOD1 y NOD2 y a los RLRs, así como la activación del inflamasoma por los NLR y RLRs y el interferón tipo I.<sup>81, 147, 179</sup> Recientemente se han identificado nuevos PRRs que detectan ADN intracelular extraño, como AIM2, IFI16 y ZBP1/DLM1.<sup>22</sup> Además de inducir una respuesta inflamatoria, la señalización de los DAMPs endógenos a través de los TLRs se ha asociado a la reparación de tejidos.<sup>151</sup> En condiciones de daño e inflamación estéril, moléculas endógenas como el HA<sup>117, 118</sup> o el HMGB1<sup>65, 239</sup>, son liberadas y regulan las respuestas del sistema inmune para la resolución de la inflamación y la reparación de tejidos.<sup>136, 140</sup>

Los DAMPs se pueden clasificar en diferentes sub-grupos en función de su localización o de su liberación (Figura I5):<sup>106</sup>

- DAMPs en la membrana plasmática que son expuestos de novo o bien aumentan su expresión: calreticulina, proteínas de choque térmico, fosfatidilserina.
- DAMPs que son secretados o liberados al espacio extracelular: HMGB1 (High Mobility Group Box 1), IL1a, ATP, ADN.
- DAMPs derivados de la membrana extracelular: HA, Heparan sulfato, Fibronectina.
- DAMPs que son originados como productos finales de degradación: ácido úrico.
- DAMPs derivados de mitocondrias.

### 1.3.1. DAMPs derivados de mitocondrias.

Recientemente, se ha descrito que las mitocondrias son una fuente de DAMPs endógenos.<sup>6, 55, 339</sup> Debido al origen endosimbionte de las mitocondrias, los componentes mitocondriales tienen propiedades inflamatorias únicas. Las mitocondrias mantienen características bacterianas como un ADN circular enriquecido en motivos CpG no metilados,<sup>45</sup> membrana doble, lípidos de membrana únicos (ej. cardiolipina), ausencia de histonas, el uso de un conjunto de ARNt y ARNr propio codificado por el genoma mitocondrial o la habilidad de N-formilar los péptidos.<sup>118, 269</sup>

Entre los DAMPs mitocondriales que se han descrito encontramos los péptidos N-formilados, el ADN mitocondrial (ADNmt) (Figura I5), reconocidos por el receptor de péptidos formilados FPR-1 y por el TLR9 respectivamente,<sup>56, 254, 339</sup> el citocromo c<sup>253</sup> o la cardiolipina<sup>74</sup>. Como hemos descrito anteriormente, del mismo modo que el resto de componentes celulares, los DAMPs mitocondriales también serían liberados por los tejidos dañados en diversas enfermedades.<sup>55, 255</sup>



El aumento del ADNmt en plasma ocurre en gran variedad de patologías, incluyendo sepsis,<sup>107</sup> cáncer,<sup>155</sup> meningitis bacteriana,<sup>182</sup> la inflamación crónica por VIH<sup>54</sup> y el trauma.<sup>338, 339</sup> Además, se han encontrado elevados niveles de ADNmt libre en el fluido de las articulaciones de pacientes de artritis reumatoide y se ha demostrado que induce inflamación *in vivo* así como artritis mediada por Mφ en un modelo murino.<sup>51, 339</sup> En este contexto, se ha demostrado que el ADNmt induce la fosforilación de la quinasa activada por mitógenos (MAPK) p38 en neutrófilos y que esta fosforilación se puede bloquear con oligodeoxinucleótidos que se unen a motivos CpG y previenen su interacción con el TLR9.<sup>117, 142</sup>

El citocromo c es otro DAMP mitocondrial que se libera de las mitocondrias de células apoptóticas o células con necrosis secundaria.<sup>6, 137</sup> Como ocurre con el ADNmt, el citocromo c también se ha encontrado en la circulación de pacientes en los que ha habido una muerte celular masiva, como en pacientes con daño hepático<sup>204</sup>, SRIS<sup>1</sup> o IM<sup>255</sup>. El citocromo c también actúa como DAMP, ya que la inyección intra-articular de citocromo c recombinante induce artritis en ratones, acompañada de la acumulación de neutrófilos y macrófagos e induce la activación de NF-κB y la liberación de citoquinas y quimioquinas en esplenocitos de ratón.<sup>253</sup> Un DAMP mitocondrial potencial es la cardiolipina, un fosfolípido abundante en la membrana de bacterias Gram negativas y que también se encuentra en la membrana interna de las mitocondrias. Se ha descrito que la cardiolipina sufre alteraciones en su localización y conformación durante la apoptosis<sup>240</sup> pudiendo llegar a ser expuesta en la superficie celular<sup>105, 287</sup> donde podría funcionar como DAMP. De hecho, se encuentran anticuerpos anti-cardiolipina en algunos pacientes con el síndrome antifosfolípido o con lupus eritematoso sistémico<sup>309</sup> y la cardiolipina induce la respuesta inmune mediada por el receptor CD1d en ratones.<sup>74</sup>

Estos componentes de las mitocondrias explican la mayor potencia de las fracciones mitocondriales en la inducción de la respuesta inmune innata mediada por los Mφ frente a otras fracciones celulares (citoplasma o núcleos).<sup>111, 112</sup> Por tanto, la liberación de los antígenos mitocondriales en el contexto del daño celular y tisular podría tener importantes implicaciones en la perpetuación de la inflamación y en la generación de tolerancia a endotoxinas.

## 1.4. Tolerancia a endotoxinas.

La tolerancia a endotoxinas es un fenómeno ampliamente observado tanto en la investigación básica como en la clínica. El Dr. Paul Beeson fue el primero en identificar el fenómeno de la tolerancia a endotoxinas en 1946, describiéndolo como la supresión de la respuesta febril en conejos expuestos a dosis repetidas de la vacuna tifoidea.<sup>24</sup> Más tarde se demostró que no

sólo reducía la fiebre, sino que la pre-exposición a dosis bajas de LPS reducía drásticamente la mortalidad en animales re-estimulados después con una dosis letal de LPS.<sup>26, 318</sup> Y en estudios en ratones, Freudenberg y Galanos demostraron el papel principal de los macrófagos en la inducción de la tolerancia a endotoxinas *in vivo*.<sup>98</sup>

El fenómeno de la tolerancia a endotoxinas consiste en una respuesta inflamatoria atenuada a un segundo estímulo inflamatorio. Inicialmente, el proceso de tolerancia era considerado como una inmunosupresión<sup>317</sup> o inmunoparálisis<sup>316</sup>, es decir, una carencia de respuesta al estímulo inductor. Sin embargo, actualmente se considera un proceso de reprogramación de la respuesta, ya que existen numerosos mecanismos moleculares que se activan cuando se produce este fenómeno.<sup>49, 153</sup>

En el contexto de los Mφ, la tolerancia a endotoxinas se engloba dentro de las respuestas anti-inflamatorias denominadas como activación alternativa o M2.<sup>246, 250</sup> En el paradigma clásico de la tolerancia a endotoxinas en Mφ, un primer estímulo con LPS activa la vía de señalización de TLR4 desencadenando la producción de citoquinas pro-inflamatorias (ej. IL6, IL12, IL1β y TNFα) o de moléculas antimicrobianas como el óxido nítrico.<sup>29</sup> El TNFα es probablemente el principal marcador del fenómeno de tolerancia, con un elevado y rápido pico de producción en respuesta a la primera dosis de LPS y una dramática reducción en el estado tolerante.<sup>29, 194</sup> Las vías de señalización iniciadas por el LPS y por estas citoquinas inducen además la secreción de citoquinas anti-inflamatorias como la IL10 o el IL1RA, proporcionando una retroalimentación negativa para regular la respuesta inflamatoria, limitando los efectos deletéreos de una inflamación excesiva. Hay otros mecanismos que limitan la respuesta pro-inflamatoria a un estímulo posterior, como el aumento de reguladores negativos (IRAK-M, MKP1, FLN29, ST2),<sup>176, 193, 228</sup> la alteración en la activación de NF-κB,<sup>49</sup> las modificaciones epigenéticas o los microARNs.<sup>20, 92</sup>

El regulador negativo IRAK-M (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase-M) es un miembro de la familia de las IRAKs que carece de actividad quinasa y que se expresa principalmente en células de origen monomielocítico. IRAK-M juega un papel importante en el establecimiento y perpetuación del fenotipo tolerante. Se ha observado que la tolerancia a endotoxina es significativamente reducida en ratones deficientes para IRAK-M<sup>152</sup> y en estudios de tolerancia *in vitro* en leucocitos humanos se ha demostrado que existe una inducción de IRAK-M durante el estado tolerante.<sup>310</sup> Por otro lado, en monocitos de pacientes con sepsis la expresión de IRAK-M frente al estímulo con LPS ocurre más rápidamente comparado con monocitos provenientes de individuos sanos.<sup>83</sup> Además, se ha descrito la sobre-expresión de IRAK-M en diversas patologías que presentan periodos de tolerancia a endotoxinas como sepsis,<sup>72</sup> SCA,<sup>69</sup> cáncer,<sup>68</sup> osteoporosis,

<sup>286</sup> enterocolitis necrotizante <sup>119</sup> y enfermedades biliares.<sup>122</sup> Aunque el mecanismo por el cual IRAK-M actúa bloqueando la cascada de señalización aún no se conoce, se sabe que IRAK-M se asocia a IRAK-4 <sup>203</sup> e IRAK-1,<sup>320</sup> lo que sugiere que esta pseudoquinasa impide la disociación del complejo IRAK-4/IRAK-1 de MyD88, inhibiendo la formación del complejo IRAK-TRAF-6 y bloqueando la vía de señalización.<sup>29, 152</sup>

Como se ha descrito anteriormente, los factores de transcripción NF- $\kappa$ B regulan la expresión de un gran número de citoquinas, incluyendo TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  o IL6. Sin embargo, a diferencia de las células sin estimular, las células tolerantes presentan una activación deficiente de NF- $\kappa$ B.<sup>49</sup> Esta inhibición está asociada a diferentes mecanismos. Por un lado, se ha descrito que existe una depleción del NF- $\kappa$ B latente en el citoplasma (p65 y p50) en células tolerantes a endotoxina, así como en pacientes de sepsis severa y trauma.<sup>3, 31, 49</sup> Por otro lado, en estos monocitos de pacientes de trauma y sepsis, así como en M $\phi$  *in vitro* con tolerancia al LPS, se ha descrito un aumento de homodímeros de p50 en relación a los heterodímeros activos p65/p50.<sup>3, 341</sup> Estudios posteriores en ratones deficientes para p50 corroboraron el papel central de la subunidad de NF- $\kappa$ B p50 en la tolerancia a endotoxina.<sup>33</sup> Los homodímeros p50 carecen del dominio de transactivación por lo que no pueden iniciar la transcripción al unirse a los promotores. De esta manera, el aumento de los homodímeros p50 ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de genes inflamatorios al competir con p65/p50 por los sitios de unión en los promotores de estos genes. Finalmente, el aumento de los niveles de las proteínas inhibitorias I $\kappa$ B $\alpha$  también se ha sugerido como parte del fenómeno de tolerancia a endotoxinas, ya que mantendrían inactivos en el citoplasma a los heterodímeros p65/p50.<sup>185, 186</sup>

Por otro lado, la reprogramación epigenética de los M $\phi$  mediante modificaciones de la cromatina es otro de los mecanismos implicados en el establecimiento de la tolerancia a endotoxinas.<sup>92</sup> Se ha descrito que el primer estímulo con LPS induce la metilación de histonas en los promotores de citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL12p40 de forma que se inhibe la transcripción de estos genes ante un estímulo posterior.<sup>92</sup> Recientemente, se ha comprobado que los microARNs también juegan un papel clave en la tolerancia a endotoxinas. MicroARNs como miR155, miR146 y miR9 se inducen por la señalización a través del TLR4 y actúan como reguladores negativos inhibiendo en varios niveles las vías de MyD88 y TRIF.<sup>20</sup>

De este modo, gracias a los mecanismos reguladores frente a un segundo estímulo con la endotoxina se produce una reducción significativa de la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL6, IL12, IL8,<sup>144</sup> mientras que citoquinas anti-inflamatorias como IL10 o TGF- $\beta$  se sobre- expresan.<sup>49, 97, 256</sup> Por otro lado, la presentación antigénica está alterada en los

Mφ tolerantes, debido a la disminución en superficie de moléculas presentadoras de antígeno MHC-II como HLA-DQ o HLA-DR.<sup>71, 208</sup> En este contexto, se ha descrito la participación de IL10 y TGF-β, sobre-expresadas en las células tolerantes, en la disminución de la expresión de moléculas MHC clase II y moléculas co-estimuladoras CD86.<sup>325</sup> Esta reducción en la expresión de moléculas HLA-DR se observa en Mφ de pacientes de sepsis o fibrosis quística.<sup>71, 308</sup>

## 1.4.1. Fenómenos de tolerancia cruzada.

El fenómeno de tolerancia a endotoxinas, a diferencia de la tolerancia inmunológica específica de antígeno, es un estado de tolerancia inespecífica.<sup>29, 47</sup> En este contexto, se ha descrito que tanto estímulos pro-inflamatorios endógenos como exógenos, así como la inflamación sistémica producida por el choque térmico, hemorrágico o el trauma pueden conducir a este estado tolerante, un proceso denominado heterotolerancia o tolerancia cruzada.<sup>141, 169, 170</sup>

El término tolerancia cruzada se aplica a todos los casos en los que la tolerancia se desarrolla a partir de un estímulo inicial de distinta naturaleza del estímulo posterior.<sup>76</sup> Entre otros, se ha descrito que el LPS, el ácido lipoteicoico (LTA), el PGN o el Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (estos 3 últimos ligandos de TLR2), inducen tanto tolerancia a una estimulación posterior con el mismo tipo de estímulo utilizado para el pre-condicionamiento, así como tolerancia cruzada a la estimulación con otros ligandos.<sup>63, 169, 271</sup> Sin embargo, aunque se induce un estado tolerante, se han observado diferencias entre la tolerancia establecida con bacterias Gram negativas (LPS) y la establecida con Gram-positivas. En la tolerancia por Gram positivas, a diferencia de la generada por el LPS, no se observan alteraciones en la interacción entre MyD88/TLR o una sobre-expresión de homodímeros p50/p50. En este caso, uno de los mecanismos propuestos es el bloqueo de la translocación al núcleo del heterodímero p65/p50.<sup>37, 76, 271</sup> La generación de tolerancia cruzada también se ha observado en la estimulación con citoquinas. Se ha descrito que el TNFα o la IL1β están involucradas en la inducción de la tolerancia a endotoxinas, tanto *in vivo* como *in vitro*.<sup>95,</sup>

129, 232

Por tanto, la tolerancia no sólo es un mecanismo específico en respuesta a la inflamación por la endotoxina, sino que parece ser un mecanismo de protección frente a una inflamación excesiva, resultando en una reprogramación anti-inflamatoria del conjunto del sistema inmune.<sup>29</sup>

## 1.4.2. Implicaciones clínicas de la tolerancia.

Si bien la respuesta anti-inflamatoria es un componente esencial para restaurar la homeostasis inmune después de un estímulo inflamatorio, un estado anti-inflamatorio exacerbado puede resultar en una inmunosupresión y conducir a la muerte del paciente debido

a la incapacidad para resolver infecciones secundarias.<sup>317</sup> Así, cuadros de inmunosupresión exacerbada, como los que pueden observarse en etapas avanzadas de sepsis, están relacionados con una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias, pudiendo producir la muerte del paciente.<sup>4, 29, 48</sup>

Además, la tolerancia a endotoxinas no se encuentra restringida sólo a los procesos de sepsis. En estudios previos de otros grupos y de nuestro laboratorio se ha descrito este fenómeno en numerosas patologías como trauma, SCA, choque hemorrágico o en fibrosis quística.<sup>59, 69, 70, 148</sup> Y en algunas enfermedades como el síndrome pulmonar agudo o la fibrosis quística, al igual que en sepsis, el fenómeno de tolerancia está asociado a una mayor susceptibilidad frente a infecciones nosocomiales.<sup>49</sup> Estos estudios describen así mismo la existencia de características comunes del fenómeno de tolerancia en diferentes enfermedades. Así, los monocitos de pacientes sépticos<sup>83</sup> y pacientes con SCA<sup>69</sup> muestran un rápido incremento en los niveles de IRAK-M y una disminuida producción de TNF $\alpha$  cuando se exponen *ex vivo* a LPS. Y en monocitos de pacientes con fibrosis quística se observó una débil presentación antigénica y una potente capacidad fagocítica,<sup>71</sup> características del fenómeno de tolerancia a endotoxinas.<sup>29</sup>

En cualquier caso, la inducción de tolerancia cruzada es un mecanismo de gran importancia para prevenir la prolongación de una excesiva inflamación. Así, en el complejo ambiente generado por el infarto de miocardio, la regulación espacial y temporal de la expresión de citoquinas, quimioquinas y factores de transcripción afectará al fenotipo de los M $\phi$ , llevando a la generación secuencial de distintas poblaciones. Sin embargo, no hay estudios que describan las funciones de las distintas poblaciones de M $\phi$  en este contexto. La mayoría de los estudios se centran en el papel de la inflamación en la patogénesis del SCA y, sin embargo, el grado de la inflamación es crucial en las complicaciones clínicas que pueden surgir a raíz de un IAM.<sup>226</sup> Por ello, en este trabajo decidimos estudiar el efecto de la inflamación sistémica en la respuesta funcional de los M $\phi$ .

## 2. OBJETIVOS



El objetivo general del presente trabajo fue estudiar el efecto que la inflamación aguda inicial producida por el infarto agudo de miocardio tiene en la reprogramación del sistema inmune, en particular de los monocitos/macrófagos, y su implicación en la generación de tolerancia a endotoxina, usando muestras de pacientes de SCA, así como modelos *in vitro*.

Para ello se establecieron los siguientes objetivos:

Estudio mediante microarrays de la expresión génica de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes de SCA varias horas después del episodio coronario.

Estudio del perfil inflamatorio, tanto basal como en respuesta a LPS *ex vivo*, en monocitos/macrófagos de sangre periférica de los pacientes de SCA, comparado con voluntarios sanos.

Determinación de los posibles factores desencadenantes de dicho perfil inflamatorio en pacientes de SCA.

Estudio *in vitro* de la capacidad de los factores identificados en pacientes de SCA de inducir tolerancia cruzada a distintos TLRs en monocitos/ macrófagos humanos.

Seguimiento de la evolución clínica de los pacientes incluidos en el estudio. Búsqueda de nuevos episodios de isquemia y/o infecciones. Correlación con datos moleculares con el objetivo de averiguar la posible asociación de las características clínicas, evolución y pronóstico con la caracterización molecular.





### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 3.1. Reactivos.

Todos los reactivos utilizados se compraron a las siguientes casas comerciales: Merck (Darmstadt, Alemania), Boehringer (Mannheim, Alemania) y Sigma (San Luis, MO, EEUU). El medio de cultivo utilizado fue DMEM (Dulbecco's MEM) de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). El medio se suplementó con 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (SFB), todo de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU).

El LPS utilizado se aisló de *Salmonella abortus*, y fue donado por los doctores Chris Galanos y Manuel Modollel, del Max Planck Institute für Immunobiologie de Freiburg, Alemania. El PGN y el Poly I:C de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). El cóctel inhibidor estándar de proteínas utilizado fue de Roche Diagnostics (Penzberg, Alemania).

## 3.2. Pacientes.

En este trabajo se reclutaron 75 pacientes con SCA admitidos consecutivamente en el Servicio de Cardiología del Hospital Universitario de La Paz y que fueron sometidos a una angiografía coronaria arterial en el periodo comprendido entre Mayo y Septiembre de 2008. El tamaño de la muestra se estimó en base a un trabajo previo de nuestro laboratorio en el que se demostraba un aumento significativo de IRAK-M en los monocitos de pacientes con SCA.<sup>69</sup> Asumiendo que el efecto de tolerización de los Mφ de sangre periférica de estos pacientes por DAMPs derivados de mitocondrias que se pretendía estudiar sería menor, se decidió aumentar el tamaño de la muestra en un 100% respecto a este estudio previo.

De estos pacientes, 45 tenían infarto agudo de miocardio (IAM), de ellos 21 con elevación del segmento t (ST) en el electrocardiograma (ECG) y 24 sin elevación del ST. Otros 30 pacientes padecían de Angina Inestable (AI). Como control del estudio se incluyeron 20 voluntarios sanos (VS) para los estudios bioquímicos y 10 VS para los estudios de mRNA, todos ellos sin historia previa de enfermedad coronaria o factores de riesgo cardiovascular y de edades y sexo equiparables. Se excluyeron aquellos pacientes con enfermedades inflamatorias agudas o crónicas, inmunodepresión, infecciones agudas o crónicas activas, con historial renal, con enfermedades hepáticas, que hubieran sido sometidos a cirugía en los 3 meses previos o que estuvieran en tratamiento con fármacos inmunosupresores.

Los pacientes con AI se clasificaron por la presencia de dolor torácico sugestivo en reposo durante las 6 horas previas, asociado a una depresión transitoria del segmento ST significativa o a una prominente inversión de la onda T, o a ambas, y sin aumentos significativos de marcadores

de necrosis miocárdica como la Creatinquinasa miocárdica (CK-MB) y la Troponina I (cTnI). Los pacientes con IAM se definieron de acuerdo con las directrices del grupo de consenso ESC/ACC 2000.<sup>11</sup> El Síndrome Coronario Agudo sin elevación del ST (SCA<sub>SEST</sub>) se diagnosticó cuando el dolor torácico típico de isquemia miocárdica con una duración mayor de 20 minutos estaba asociado a un aumento significativo de los niveles de cTnI (2 veces superior a los niveles máximos del rango normal), con o sin depresión del segmento ST o inversión de la onda T en el ECG. El Síndrome Coronario Agudo con elevación del ST (SCA<sub>CEST</sub>) se diagnosticó por la presencia de dolor torácico durante más de 20 minutos, combinado con una elevación del ST en el ECG y con aumento en la cTnI.<sup>13</sup> Todos los pacientes recibieron los cuidados clínicos estándar según las directrices publicadas por la Asociación Americana del Corazón (AHA) y la Sociedad Europea de Cardiología (ESC).<sup>231</sup>

Todos los pacientes fueron sometidos a angiografía coronaria, bien con carácter de emergencia, o bien por un diagnóstico programado durante la hospitalización. Todos los pacientes de los 3 grupos fueron diagnosticados con enfermedad de las arterias coronarias (EAC) basándose en los angiogramas coronarios. A todos los pacientes con SCA<sub>CEST</sub> se les practicó una intervención coronaria percutánea (ICP) dentro de las 12 horas posteriores al comienzo del dolor torácico.

Se practicó una cineangiografía coronaria selectiva desde el acceso vía femoral percutánea (Judkins) o braquial (Sones). Se obtuvieron múltiples visualizaciones en todos los pacientes, con las arterias coronarias descendente anterior izquierda y circunfleja izquierda visualizadas en al menos 4 orientaciones y la arteria coronaria derecha en al menos 2 orientaciones. Todos los angiogramas fueron interpretados de manera independiente por 2 o más observadores experimentados.

El grado de estenosis se definió como el mayor porcentaje de reducción en el diámetro luminal en alguna de las visualizaciones comparada con el segmento normal más cercano (porcentaje del diámetro de la estenosis) y se determinó utilizando la técnica caliper. El Vessel Score indica el número de arterias coronarias con una estenosis  $\geq 70\%$  ( $\geq 50\%$  para la arteria coronaria izquierda principal).<sup>294</sup> La puntuación varió de 0 a 3 dependiendo del número de vasos implicados. La estenosis de la arteria coronaria principal izquierda se puntuó como una enfermedad de 2 vasos. La puntuación de vasos fue 3 en 6 pacientes (8%), 2 en 24 (32%), 1 en 31 (41 %), y 0 en 14 (19%). El tronco principal izquierdo estaba afectado en 3 pacientes (4%), la arteria coronaria descendente anterior izquierda en 41 (55%), la arteria coronaria circunfleja en 32 (43%) y la arteria coronaria derecha en 37 (49%).

No se hallaron diferencias significativas en la cTnI o en el grado de la severidad de la estenosis coronaria entre los pacientes de SCASEST y SCACEST. La cTnI y el Péptido Atrial Natriurético tipo B (BNP) en plasma fueron analizados inmediatamente en las muestras de sangre-EDTA-no coagulada tras la admisión. El cTnI se midió utilizando el kit de inmunofluorescencia de Dade-Behring (Marburg, Alemania). La sensibilidad del ensayo es de 0,1 ng/ml y el límite máximo normal para el diagnóstico de IAM se consideró en 1,0 ng/ml. El BNP se analizó mediante el ensayo cuantitativo de inmunofluorescencia de Biosite (San Diego, USA). La sensibilidad del ensayo es de 0,5 pg/ml y el límite máximo normal se considero en 100 pg/ml

Todos los participantes, pacientes y VS, firmaron el consentimiento informado. El protocolo seguido en este estudio se ajusta a la propuesta de principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975 y fueron aprobadas por el Comité de Ética del Hospital Universitario de La Paz.

### 3.2.1. Estudio de seguimiento

La información para el seguimiento de los pacientes se obtuvo por las visitas periódicas mensuales en las clínicas ambulatorias, por los informes de alta en el caso de la admisión en urgencias y por entrevistas telefónicas con el paciente, un pariente cercano o su médico de cabecera.

### 3.3. Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica.

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas fueron aisladas bien de *buffy coats* o bien de sangre periférica de VS y de pacientes con SCA. En ambos casos, se aislaron las CMSP por centrifugación en gradiente de densidad, utilizando el reactivo Ficoll-Hypaque Plus de Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, EEUU).

Para aislar los monocitos, se cultivaron las CMSP durante 1h en DMEM con 1% de antibiótico y sin suero a una densidad de  $10 \times 10^6$  células/ml. Después de este periodo, se aspiró el sobrenadante y se lavó 3 veces con solución tampón PBS para eliminar las células no adheridas. En el caso de *buffy coats*, las células adheridas se dejaron durante 16 h en DMEM suplementado con 10% de SFB antes de realizar cualquier tratamiento. En pacientes y VS se llevaron a cabo los ensayos inmediatamente después del aislamiento con el fin de valorar las características que los M $\phi$  tenían *in vivo*.

En todos los cultivos se testó la homogeneidad de la población de M $\phi$ , analizando la expresión superficial del marcador CD14 por citometría de flujo. Las células adheridas expresaban el marcador en un  $(85,6 \pm 2,3 \%)$  (Media  $\pm$  Desviación Estándar;  $M \pm DE$ ). Esta metodología se ha usado en varios trabajos en nuestro laboratorio <sup>68, 69, 71, 83</sup>

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se purificaron a partir de las CMSP por selección negativa. Por medio de técnicas de purificación inmunomagnéticas los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se aislaron por depleción utilizando el coctel de bolitas magnéticas Dynabeads Untouched Human CD4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Se analizó la pureza de la población por citometría de flujo y se utilizaron los linfocitos si ésta era >90%.

### 3.4. Determinación de la concentración de ADN mitocondrial en las muestras clínicas.

Se aisló el ADN total de suero por duplicado con el kit QIAampDNA Mini kit (Qiagen, GmbH, Alemania) según las instrucciones del fabricante para la extracción en suero, con la siguiente modificación: la elución en el último paso se realizó en 50 µl de Tris 10mM pH8. Para determinar la cantidad de copias de ADN mitocondrial (ADNmt), se cuantificó el gen mitocondrial *12S rARN* utilizando el sistema de PCR cuantitativa a tiempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU). Los cebadores que se utilizaron fueron los siguientes: 5'CCACGGGAAACAGCAGTGAT3' y 5'CTATTGACTTGGGTAAATCGTGTGA3'. La sonda TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU) utilizada fue 6FAM-5'TGCCAGCCACCGCG3'-MGB marcada en el extremo 5' con el fluorocromo 6FAM. La reacción de 20µl para la qPCR contiene: 1× TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems P/N 4304437), 112nM de cada cebador, 125nM de la sonda TaqMan y 5µL del extracto de ADN total. Las condiciones de la qPCR fueron 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95°C y 60 segundos de hibridación/extensión a 60°C. Se utilizaron curvas de calibración para cuantificar el ADNmt tal y como se ha descrito previamente.<sup>15</sup> Se calculó la media del número de copias de ADNmt obtenido en las dos extracciones para cada muestra de suero. Los resultados se expresan como nº de copias de ANDmt/ µL suero.

### 3.5. Aislamiento de la fracción mitocondrial.

Para aislar las mitocondrias se siguió el protocolo de Fernandez-Vizarra *et al.*<sup>86</sup>, con algunas modificaciones. Se partió de la línea celular HeLa que se mantuvo en un medio DMEM suplementado con un 10% de SFB y un 1% de la mezcla de penicilina y estreptomicina. Se recogieron las células con tripsina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) y se lavaron dos veces en 1 mM Tris-HCl (pH 7), 0,13 M NaCl, 5 mM KCl, 7,5 mM. Se añadió la mitad del volumen del pellet celular de solución de homogenización (3,5 mM Tris-HCl (pH 7.8), 2 mM NaCl, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>). La homogenización se realizó manualmente con una jeringuilla de 23-G (15 aspiraciones) lo que favorece el rendimiento en la obtención de la fracción mitocondrial. Inmediatamente después

se añadió un noveno del volumen de homogenado de 0,35 M Tris-HCl (pH 7.8), 0.2 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>. Se centrifugaron las muestras a 1600g 3 minutos a 4°C para eliminar núcleos y otras fracciones densas. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones para eliminar cualquier resto de fracciones densas. El sobrenadante final se centrifugó a 13.000g 2 minutos a 4°C para sedimentar la fracción mitocondrial. Los sobrenadantes resultantes se consideran como fracción citosólica. Los sedimentos mitocondriales se lavaron primero con 35 mM Tris-HCl (pH 7.8), 20 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, y después dos veces con 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0,32 M sucrosa y fueron resuspendidos finalmente en el buffer correspondiente. Todo el proceso de fraccionamiento se llevó a cabo a 4°C.

Al tratarse de una fracción enriquecida que también contiene otros orgánulos como pueden ser el retículo endoplasmático, se analizó por citometría de flujo para asegurarnos de que estábamos obteniendo mayoritariamente mitocondrias. Se incubaron las fracciones mitocondriales resuspendidas en PBS con 1 µM de MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen/ Molecular Probes, Carlsbad, CA, EEUU), un fluorocromo selectivo de mitocondrias,<sup>60</sup> 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con PBS para eliminar el exceso de MitoTracker y se analizó con el citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) en base a los parametros Forward y Sideward Scatter y a la fluorescencia roja. Se analizó así mismo una fracción celular total como control. Prácticamente todas las partículas de la fracción mitocondrial eran positivas para la fluorescencia roja, confirmando el gran enriquecimiento en mitocondrias obtenido mediante el método de fraccionamiento utilizado (Figura M1 A).

### 3.6. Preparación de los lisados mitocondriales y el ADN nuclear y mitocondrial.

Una vez obtenida la fracción mitocondrial se resuspendió en 500µl de PBS y 4:100 de cóctel inhibidor de proteasas (Roche) y se lisaron con ciclos de 5 minutos de congelación-descongelación utilizando un baño de hielo seco/ etanol y un baño a 37°C. La suspensión de mitocondrias fragmentadas se centrifugó a 13.000g 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se utilizaron para los tratamientos con lisado mitocondrial (LisMt). La concentración de proteínas se determinó utilizando el kit BCA Protein Assay (Pierce) siguiendo las indicaciones del fabricante.

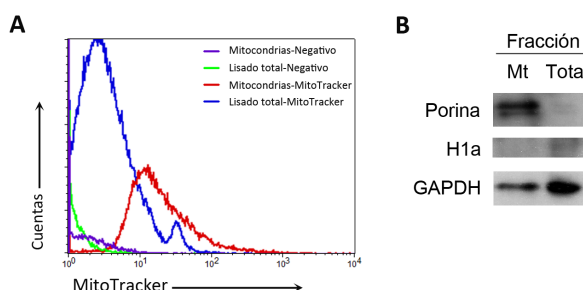


Figura M1. Análisis de la pureza de los extractos mitocondriales. A, Histograma de la incorporación de MitoTracker-CMXRos para las fracciones total (azul) y mitocondrial (rojo). B, Western Blot de los lisados de la fracción mitocondrial (Mt) y total.



La pureza de los lisados se comprobó mediante WB (Figura M1 B). Se utilizaron las proteínas Porina/VDAC1, H1a y GAPDH como control mitocondrial, nuclear y de carga, respectivamente. Se comprobó que los extractos mitocondriales no contenían la proteína nuclear H1a y sin embargo presentaban grandes cantidades de la proteína mitocondrial Porina.

El ADN mitocondrial (ADNmt) se extrajo a partir de la fracción mitocondrial y el ADN nuclear (ADNnu) a partir de la fracción nuclear utilizando el kit QIAampDNA Mini kit (Qiagen). La concentración y pureza del ADN se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). Los extractos de ADN no contenían contaminación proteica según la relación de absorbancia A260/A280. Para determinar la contaminación de ADNnu presente en los extractos de ADNmt y viceversa, se cuantificó para cada muestra por duplicado el gen mitocondrial *tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)* y el gen de copia única nuclear *β-2-microglobulin* (*β2M*), utilizando el sistema de qPCR y basándose en publicaciones anteriores.<sup>315</sup> Los cebadores y sondas utilizados se especifican en la Tabla M2. Las condiciones de la qPCR fueron 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95°C y 30 segundos de hibridación/extensión a 62°C. La cantidad de ADNmt se ha expresado como la proporción del número de copias del gen mitocondrial *tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)* frente al número de copias del gen nuclear *β2M* utilizando la fórmula:  $2 \times 2^{(\Delta CT)}$ , donde  $\Delta CT$  es la diferencia entre los valores de crossing point (CT) del gen *β2M* y el gen *tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)* (Tabla M1).<sup>315</sup>

Todos los extractos fueron preparados en condiciones de esterilidad y se comprobó que todos estaban libres de endotoxinas con el kit Sigma E-Toxate™ reagent de *Limulus polyphemus* (Sigma).

**Tabla M1. Cuantificación del contenido de ADNnu en el extracto de ADNmt.**

Extracto	Promedio CT		Ratio copias ADNmt/ ADNnu	Porcentaje ADNmt/ADN total*
	<i>β2M</i>	<i>tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)</i>		
ADNnu	29,30	21,87	346,08	0,57
ADNmt	30,37	17,76	12503,11	20,83

\*Se asume que 60000 moléculas de ADNmt pesan 1 pg.

## 3.7. Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc.

Después de cada uno de los tratamientos se lavaron los Mφ con PBS y se aisló el ARN total utilizando el kit High Pure RNA Isolation (Roche Diagnostics), el cual incluye tratamiento con DNasa I para eliminar el ADN contaminante. En todos los casos, se tomaron las precauciones

oportunas para evitar contaminaciones con Ribonucleasas (RNasas). La concentración y pureza del ARN se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). A continuación se realizó la retrotranscripción de 1 µg de ARN a ADN complementario (ADNc) utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) en un volumen final de 20 µl y siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 3.8. PCR a tiempo real.

Los niveles de expresión de cada uno de los genes estudiados en el presente trabajo se analizaron por qPCR en tiempo real utilizando el ADNc obtenido según se describe en el apartado 3.12. Para las reacciones de qPCR se utilizó el kit Quantimix Easy SYG (Biotools, Madrid, España) y el termociclador LightCycler (Roche Diagnostics). Los cebadores específicos se detallan en la Tabla M3. Todos fueron sintetizados, desalados y purificados mediante HPLC por Bonsai Biotech (Alcobendas, Madrid). Para confirmar la especificidad de los cebadores, se analizaron los perfiles de “melting” o desnaturalización. Estos perfiles se determinaron manteniendo la reacción a 80°C durante 10 segundos y luego, calentando hasta 95°C a una tasa de calentamiento de 0,1°C/segundo. A lo largo de este proceso se midió la fluorescencia emitida. Con este análisis se verificó que para cada par de cebadores se producía un único producto de amplificación. Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se analizaron por transiluminación ultravioleta. En todos los casos se comprobó que para cada par de cebadores el producto de amplificación era una única banda del tamaño esperado.

**Tabla M2. Secuencia y Tm de los cebadores utilizados en PCR cuantitativa.**

GEN	CEBADOR DIRECTO 5'-3'	CEBADOR REVERSO 5'-3'	Tm (°C)
<b>CCL18</b>	CCCTCCTTGCTCCTCGTCTG	GCTTCAGGTCGCTGATGTATT	62
<b>CCL2/MCP-1</b>	GATCTCAGTGCAGAGGCTCG	TGCTTGTCAGGTGGTCCAT	60
<b>IL10</b>	ATGCCCCAAGCTGAGAACCA	TCTCAAGGGGCTGGGTCAGC	58
<b>IL12p40</b>	CGGTCATCTGCCGCAA	TGCCATTCGCTCCAAGA	55
<b>IL1β</b>	GGATATGGAGCAACAAGTGG	ATGTACCAGTTGGGGAAGT	57
<b>IL6</b>	ATTCGGTACATCCTCGAC	GGGGTGGTTATTGCATC	54
<b>IRAK-M</b>	TTTGAATGCAGCCAGTCTGA	GCATTGCTTATGGAGCCAAT	59
<b>MIF</b>	CTCTCCGAGCTACCCAGCAG	CGCGTTCATGTCGTAATAGTT	60
<b>TGF-β</b>	GGCCAGATCCTGTCCAAGC	GTGGGTTTCCACCATAGCAC	62
<b>TNFα</b>	GCC TCT TCTCCTTCTGATCGT	CTCGGCAAAGTCGAGATAGTCG	62
<b>tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)</b>	CACCCAAGAACAGGGTTTGT	TGGCCATGGGTATGTTGTTA	62
<b>VEGFA</b>	GCAGCTTGAGTTAAACGAACG	GCAGCGTGGTTTCTGTATC	60
<b>β-2M</b>	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT	62
<b>β-actina</b>	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	CTCCTTAATGTCACGCACGATTC	60

La cuantificación del cADN de cada uno de los genes de interés se llevó a cabo utilizando una curva estándar de siete puntos específica para cada gen. Para ser aceptadas como válidas, los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) de estas curvas fueron siempre  $> 0.98$ . En cada reacción de qPCR se incluyó la curva estándar además de las muestras. Cada programa de qPCR consiste en 45 ciclos con una temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) específica para cada par de cebadores. Para confirmar la especificidad de los productos de la reacción, en cada experimento se analizaron los perfiles de desnaturalización de cada grupo de muestras. Los resultados obtenidos para cada uno de los genes analizados se normalizaron con respecto a la expresión del gen  $\beta$ -actina. Esta metodología ha sido utilizada por nuestro grupo en varios trabajos anteriores.<sup>71, 113</sup>

### 3.9. Cytometric Bead Array (CBA).

Los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos celulares se valoraron utilizando el kit Cytometric Bead Array (CBA) y el kit Flex Set de la casa comercial BD Biosciences (San Jose, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 3.10. Análisis por citometría de flujo.

Los M $\phi$  tratados con los distintos estímulos se recogieron para el análisis de distintas proteínas de superficie. Se lavaron con PBS y se incubaron 20 minutos a 4°C con el anticuerpo especificado en cada caso. Los anticuerpos utilizados en el presente trabajo, su tipo, especie de procedencia, y la compañía suministradora se muestran en la Tabla M3. Pasado el tiempo de incubación se lavaron las células con PBS y se analizaron por citometría de flujo usando el citómetro FACSCalibur de BD Biosciences (San Jose, EEUU). Los datos fueron analizados con el programa FlowJo (Tristar, EEUU).

### 3.11. Análisis por Western Blot.

La cuantificación de proteína de las muestras se hizo utilizando el kit BCA Protein Assay (Pierce) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para las rectas patrón de proteína se utilizó una solución comercial de BSA (albúmina sérica bovina), a una concentración de 2mg/ml (Pierce).

Para el análisis por Western Blot, las proteínas se desnaturalizaron por calentamiento a 95°C durante 5 minutos en solución tampón Laemmli. Posteriormente se separaron por electroforesis en geles al 12 % de SDS-poliacrilamida, en tampón Tris-glicina-SDS (25 mM Tris-HCl, 250 mM glicina, 0,1 % SDS) con el sistema de electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad). Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P Transfer

**Tabla M3. Anticuerpos de citometría de flujo.**

ANTICUERPO	ESPECIE RECONOCIDA	TIPO	ORIGEN	COMPAÑÍA
<b>Anti-CD14-APC</b>	Humano	Monoclonal conjugado con Allophycocyanin (APC)	Ratón	Immunostep, Salamanca, España
<b>Anti-HLA-DR-APC</b>	Humano	Monoclonal conjugado con APC	Ratón	Immunostep, Salamanca, España
<b>Anti-HLA-DQ-PE</b>	Humano	Monoclonal conjugado con Phycoerythrin (PE)	Ratón	Immunostep, Salamanca, España
<b>Anti-CD66b-FITC</b>	Humano	Monoclonal conjugado con fluorescein isothiocyanate (FITC)	Ratón	Immunostep, Salamanca, España
<b>Anti-CD3-PE</b>	Humano	Monoclonal conjugado con (PE)	Ratón	Immunostep, Salamanca, España
<b>Anti-CD163-PE</b>	Humano	Monoclonal conjugado con (PE)	Ratón	Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EEUU
<b>Anti-CD1a-FITC</b>	Humano	Monoclonal conjugado con FITC	Ratón	Serotec, Oxford, Reino Unido

Membrane, Millipore), utilizando un sistema de electrotransferencia y aplicando una corriente eléctrica de 200mA durante 1 hora y media a 4 °C. Sobre la membrana se realizó la inmunodetección de las proteínas de interés mediante los anticuerpos específicos correspondientes (ver Tabla M4). Las membranas se bloquearon durante 1h con 5 % de leche desnatada en solución tampón TTBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,2 % Tween 20). Tanto el bloqueo como la incubación con el anticuerpo primario, se realizó a temperatura ambiente durante 1 h o a 4°C durante una noche, y en agitación suave. Tras varios lavados con TTBS, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes en TTBS durante 45 minutos a temperatura ambiente. En todos los casos, los anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados con el enzima HRP (Horse-Raddish Peroxidase) y la detección se realizó mediante el sistema ECL (Enhanced Chemiluminiscent System, Amersham).

**Tabla M4. Anticuerpos utilizados para Western Blot.**

ANTICUERPO	ESPECIE RECONOCIDA	TIPO	ORIGEN	COMPAÑÍA
<b>Anti-VDAC1</b>	Humano	Policlonal	Conejo	Abcam, Cambridge RU
<b>Anti-H1a</b>	Humano	Policlonal	Cabra	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EEUU
<b>Anti-GAPDH</b>	Humano	Policlonal	Conejo	Sigma, San Luis, MO, EEUU

## 3.12. Ensayo de ELISA

Para analizar los niveles de HA presentes en el plasma de los pacientes de SCA y los VS, se realizaron ensayos de ELISA de la casa comercial R&D (Hyaluronan DuoSet; R&D Systems, Minneapolis, E.UU) en placas de poliestireno de fondo plano, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

## 3.13. Array de anticuerpos.

Se midió la concentración de varias citoquinas y quimioquinas del plasma de los pacientes de SCA y VS utilizando el array de anticuerpos Quantibody® Human Inflammation Array 3 de RayBiotech (Norcross, GA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los arrays se escanearon con el programa ScanArray Express (Microarray Analysis System, versión 3.0.0.0016, PerkinElmer, Massachusetts, USA). Los datos fueron analizados con el programa TMEV versión 4.4.1.<sup>268</sup>

## 3.14. Arrays de expresión génica.

Para llevar a cabo los estudios de expresión génica de los pacientes con SCA, se aisló en ARN de las CMSP inmediatamente después de la separación por gradiente de Ficoll (ver apartado 3.3). La concentración, pureza e integridad del ARN se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific).

### 3.14.1. Amplificación y marcaje del ARN.

Para la amplificación y marcaje del ARN se siguió el protocolo de Agilent Technologies (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol, Palo Alto, CA, EEUU). De manera resumida, se retrotranscribieron 200-700ng de ARN utilizando el cebador del promotor T7 y MMLV-RT. A partir de este cADN se obtuvo el cARN utilizando la T7 ARN polimerasa, que amplifica el material diana e incorpora el marcaje de cianina 3-CTP (Cy3).

### 3.14.2. Protocolo de Hibridación, Lavado, Escáner y Análisis de imágenes.

Una vez obtenido el cARN marcado con Cy3, se hibridaron 1,65µg de cARN en el Whole Human Genome Microarray 4x44K (G4112F, Agilent Technologies) durante 17 horas / 65°C / 10 rpm en una concentración en solución tampón GEx Hybridization Buffer HI-RPM, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol). El protocolo de lavado y secado se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los arrays se escanearon en el Microarray Scanner (G2565BA, Agilent Technologies) utilizando los parámetros por defecto para el formato de 4X44K para arrays de un solo color. Los análisis de las imágenes se hicieron utilizando el software Feature Extraction, versión 9.5.3.1 (Agilent Technologies).

### 3.14.3 Análisis de los arrays de expresión génica.

#### 3.14.3.1 Análisis estadísticos.

Para verificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas se utilizaron dos programas: el TMEV versión 4.4.1.<sup>268</sup> Para comparar los 3 grupos de pacientes se utilizó el programa TMEV usando el test ANOVA de una vía, seguido de un agrupamiento jerárquico mediante la correlación de Pearson de los pacientes con análisis Bootstrap para determinar la estabilidad de los agrupamientos. De esta forma se agruparon las distintas muestras en función de su patrón de expresión. Este tipo de agrupamientos se basan en la distancia para medir la similitud entre los grupos, de forma que se hace un agrupamiento jerarquizado uniando aquellos elementos con menor distancia. Los resultados de estos análisis se representan en forma de dendrogramas. Este análisis se realizó con el paquete R pvclust que calcula los p-valores imparciales (AU: Approximately Unbiased) y los p-valores de probabilidad bootstrap (BP: Bootstrap Probability). El valor AU se calcula a través de un remuestreo multiescala bootstrap y se ha demostrado que proporciona una mejor indicación del respaldo de los clusters que los métodos tradicionales de bootstrapping (valor BP).<sup>296</sup>

A continuación se aplicó el Análisis de Componentes Principales (ACP) al grupo de pacientes en base a los genes expresados diferencialmente con un p-valor  $<0,05$  tras el test de ANOVA de una vía. Con este análisis se consigue la representación en pocas dimensiones de todos los valores numéricos de las diferentes muestras estudiadas para facilitarnos la interpretación de los datos.<sup>260</sup> Ante un conjunto de datos con muchas variables, es decir, cada uno de los valores de expresión de cada gen, el objetivo es reducirlas a un número menor de variables, perdiendo la menor cantidad de información posible. Se trata de encontrar una serie de componentes capaces de explicar la mayor parte de la varianza total de las variables originales. De esta forma se pueden percibir más fácilmente las relaciones entre las muestras. La elección de los factores o componentes se realiza de tal forma que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad del experimento. El segundo factor debe recoger la máxima variabilidad no recogida por el primero, y así sucesivamente. El número de componentes principales por defecto es de 3. En la representación gráfica de estos 3 componentes principales se pueden comparar las diferencias entre las distintas muestras.

Para comparar sólo los grupos de AI y SCACEST, se utilizó el programa Babelomics y el algoritmo limma test.<sup>285</sup> Se generó un archivo de salida con la siguiente información: identificador del gen, p-valor (significación), y el *fold change* o medida del cambio del gen entre los grupos. A continuación, se realizó el agrupamiento jerárquico de los pacientes y de los genes expresados diferencialmente con un p-valor <0,05, utilizando la correlación de Pearson. Para este agrupamiento jerárquico se generó un archivo con una primera columna en la que se incluyó el identificador de la sonda de los genes expresados diferencialmente, mientras que en el resto de columnas se incluyeron los datos del nivel de intensidad obtenido para cada sonda y muestra de los grupos que se compararon.

### 3.14.4. Análisis del perfil de expresión génica con Ingenuity Pathway Analysis®.

El análisis funcional para identificar los mecanismos biológicos, las rutas de señalización y las categorías funcionales de los grupos de genes seleccionados por el análisis estadístico limma, se realizó a través del programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (Ingenuity Systems®, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com), Mountain View, EE.UU).<sup>43</sup> El análisis IPA está fundado en una base de datos actualizada continuamente, que contiene información de más de 20.000 genes y proteínas de mamíferos, 1,4 millones de interacciones biológicas y más de 100 rutas de señalización.

A partir de la tabla obtenida del test limma, el análisis IPA asignó a cada gen su correspondiente identificador y se superpusieron estos genes en la red global de interacciones desarrollada a partir de la información contenida en la base de datos del IPA.

En el **análisis funcional** se identificaron las funciones biológicas alteradas y las enfermedades asociadas más significativas para el conjunto de datos. Se utilizó el test exacto de Fischer para calcular el p-valor que determina la probabilidad de que cada función biológica y cada enfermedad asignada al conjunto de genes sean asignadas únicamente por azar. El p-valor se representa en los gráficos como  $-\log(\text{p-valor})$ . El análisis IPA agrupa los genes de acuerdo a los procesos biológicos en los que están implicados. El criterio aplicado para la búsqueda de las principales categorías funcionales fue el máximo número de genes y el p-valor. El rango de p-valor entre  $2,12 \times 10^{-12}$  y  $1,09 \times 10^{-3}$  se consideró estadísticamente significativo.

Se calculó también el z-score para cada función biológica. El z-score indica cuántas desviaciones estándar, por encima o por debajo de la media, está un determinado valor. A mayor z-score, mayor es la desviación de la expresión del gen de la media, indicando la significación del cambio de expresión. Así, una función se considera aumentada si el z-score es muy alto comparado con fluctuaciones al azar, o disminuida, si el z-score es muy bajo comparado con la previsión al azar.

El **análisis de las rutas de señalización** identifica las rutas de señalización de la base de datos IPA más significativas para el conjunto de genes. La significación de la asociación entre los genes de la tabla de datos y la vía de señalización de IPA se calcula según se describe en el programa: 1) se calcula la relación entre el número de genes de la tabla de datos en una determinada vía, dividido entre el número total de genes que componen esa vía; 2) el test exacto de Fischer calcula el p-valor (representado como  $-\log(\text{p-valor})$ ) que determina la probabilidad de que la asociación entre los genes en la tabla de datos y la vía de señalización sea solamente por azar.

El análisis de IPA calcula además los posibles efectos tóxicos asociados al conjunto de genes, los factores de transcripción que estaban afectados según el número de sus dianas presentes en el conjunto de genes diferencialmente expresados.

### 3.15. Tratamientos.

Los cultivos de M $\phi$  humanos se llevaron a cabo en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico. Los cultivos se mantuvieron en todos los casos en condiciones estables de temperatura (37°C), humedad relativa (90%) y presión de CO<sub>2</sub> (5%).

En el caso de pacientes y voluntarios sanos, inmediatamente después del aislamiento los M $\phi$  se estimularon con 10ng/ml de LPS. A las 3h se aisló el ARN para la posterior cuantificación de la expresión de distintos genes. En paralelo se llevó una placa de M $\phi$  no tratados (control).

En los experimentos *in vitro* con M $\phi$  de *buffy coats*, se realizaron los distintos tratamientos pasadas las 16h de recuperación tras el aislamiento. Dependiendo del experimento, los M $\phi$  fueron tratados bien con 5 $\mu$ g/ml de ADNmt o ADNnu, o bien con 20 $\mu$ g/ml de lisado mitocondrial (denominado LisMt) durante 5 días (Figura M1). En todos los casos, en paralelo se estimuló una placa con LPS 10ng/ml durante 5 días como control del modelo clásico de tolerancia a endotoxinas<sup>71</sup> y se mantuvo otra placa sin tratamiento (control negativo). Tras los 5 días de estimulación, se recogieron los sobrenadantes para la posterior valoración de la secreción de citoquinas, se lavaron las placas con PBS y todas se re-estimularon con LPS 10ng/ml. A las 24h de estimulación se recogieron tanto los sobrenadantes, para la valoración de la secreción de citoquinas, como las células para su análisis por citometría de flujo.

Para los experimentos con PGN y Poly I:C, se utilizó el mismo modelo experimental que para el LPS. El PGN se utilizó a una concentración final de 10ng/ml y el Poly I:C a 5 $\mu$ g/ml.

En todos los casos se mantuvieron cultivos control sin ningún tratamiento.



## 3.16. Cultivos mixtos de Mφ y linfocitos T CD4.

Para los cultivos mixtos de Mφ y linfocitos T CD4+ heterólogos (aislados como se describe en el apartado 3.3), los Mφ se sembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en medio competo y se trataron como se describe en el apartado anterior (Figura M1). Al finalizar el segundo tratamiento con LPS, se retiró completamente el medio de cultivo, se lavaron las células 3 veces con PBS y se añadieron los linfocitos T CD4+ heterólogos en una proporción Mφ:Linfocitos de 1:5. Los cultivos control contenían Mφ o linfocitos T CD4+ solos. Tras 96h de co-cultivo, se recogieron los sobrenadantes para valorar la producción de citoquinas.<sup>159</sup>

## 3.17. Índice M1/M2.

El Índice M1/M2 se calculó en base a los niveles de expresión de ARNm de TNFα e IL10 en los Mφ de los pacientes de SCA, tanto a nivel basal como tras el estímulo con LPS (3 horas, 10ng/ml). Basándonos en estudios previos,<sup>214</sup> a nivel basal se establecieron 5 grupos: M1, que corresponde a la activación pro-inflamatoria clásica, M2, que corresponde a la activación alternativa o anti-inflamatoria, M0, que corresponde al estado basal del Mφ; y dado que la polarización del Mφ es un continuo, se consideraron dos estados intermedios: M0/M1 y M0/M2.

A continuación se describe con detalle el criterio seguido para la clasificación:

- M1: [TNFα en pacientes] > [Media + desviación estándar (M+DE) de TNFα en VS] y [IL10 en pacientes] < [M-DE de IL10 en VS].
- M0/M1: [TNFα en pacientes] > [M+DE de TNFα en VS] y [IL10 en pacientes] = [M±DE de IL10 en VS] o bien [TNFα en pacientes] = [M±DE de TNFα en VS] y [IL10 en pacientes] < [M-DE de IL10 en VS].
- M0: [TNFα en pacientes] = [M±DE de TNFα en VS] y [IL10 en pacientes] = [M±DE de IL10 en VS].
- M0/M2: [TNFα en pacientes] < [M-DE de TNFα en VS] y [IL10 en pacientes] = [M±DE de IL10 en VS] o bien [TNFα en pacientes] = [M±DE de TNFα en VS] y [IL10 en pacientes] > [M+DE de IL10 en VS].
- M2: [TNFα en pacientes] < [M-DE de TNFα en VS] y [IL10 en pacientes] > [M+DE de IL10 en VS].

- Tras la exposición a LPS, no existe un estado M0, ya que los VS tendrán una respuesta pro-inflamatoria clásica o M1. Por ello, se establecieron 4 categorías, M1, M1-alto, M1/M2 y M2:
- M1-alto: [TNF $\alpha$  en pacientes] > [M+DE de TNF $\alpha$  en VS] y [IL10 en pacientes] < [M-DE de IL10 en VS].
- M1: [TNF $\alpha$  en pacientes] = [M $\pm$ DE de TNF $\alpha$  en VS] y [IL10 en pacientes] = [M $\pm$ DE de IL10 en VS] o bien [TNF $\alpha$  en pacientes] > [M+DE de TNF $\alpha$  en VS] y [IL10 en pacientes] = [M $\pm$ DE de IL10 en VS] o bien [TNF $\alpha$  en pacientes] = [M $\pm$ DE de TNF $\alpha$  en VS] y [IL10 en pacientes] < [M-DE de IL10 en VS].
- M1/M2: [TNF $\alpha$  en pacientes] < [M-DE de TNF $\alpha$  en VS] y [IL10 en pacientes] = [M $\pm$ DE de IL10 en VS] o bien [TNF $\alpha$  en pacientes] = [M $\pm$ DE de TNF $\alpha$  en VS] y [IL10 en pacientes] > [M+DE de IL10 en VS].
- M2: [TNF $\alpha$  en pacientes] < [M-DE de TNF $\alpha$  en VS] y [IL10 en pacientes] > [M+DE de IL10 en VS].

### 3.18. Análisis estadístico.

El número de experimentos analizados se indica en cada pie de figura. Como mínimo se analizaron 3 experimentos independientes y los datos se expresan como M $\pm$ DE. Las comparaciones estadísticas se han realizado mediante el test *t-student* para las comparaciones de dos muestras o la ANOVA de una vía y el test de Dunnet para comparaciones múltiples. Las correlaciones se analizaron utilizando el coeficiente de correlación de Spearman para muestras con distribución no normal. Se consideraron como diferencias significativas si el p-valor < 0.05. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, EEUU).



## 4. RESULTADOS



#### 4.1. Características clínicas de los pacientes de SCA reclutados para el estudio.

Para estudiar la respuesta inmune innata en los pacientes con SCA se reclutaron 75 pacientes y 20 voluntarios sanos (VS) de edad y sexo equivalentes. Las características clínicas y angiográficas de los pacientes estudiados se recogen en la Tabla R1. Según lo esperado, los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM), agrupados en SCACEST y SCASEST, tienen con mayor frecuencia síntomas relacionados con cardiopatías isquémicas (CI) y significativamente mayor número de factores de riesgo, comparado con los pacientes de Angina Inestable (AI). También existen diferencias entre los pacientes con IAM y los pacientes de AI en los recuentos leucocitarios, los niveles de glucosa en sangre y el número de vasos con estenosis significativa, todos ellos mayores en los pacientes con IAM. Las angiografías coronarias revelaron que 17 pacientes tenían lesiones en una arteria, 31 tenían lesiones en dos arterias y 27 tenían lesiones en tres arterias. No se encontraron diferencias significativas en la severidad de la estenosis entre los grupos SCASEST y SCACEST.

En los tres meses posteriores al alta hospitalaria, 6 pacientes con IAM sufrieron infección del tracto urinario (ITU), dos de ellos eran pacientes con SCASEST y cuatro pacientes con SCACEST (Tabla R1). Un paciente del grupo SCASEST padeció una neumonía comunitaria. Sin embargo, ningún paciente con AI desarrolló un episodio infeccioso durante el mismo periodo de observación.

Los marcadores bioquímicos determinados para los 75 pacientes reclutados se detallan en la Tabla R2. En todos los parámetros analizados se encontraron diferencias significativas entre los grupos SCACEST y AI. Las diferencias entre los grupos SCASEST y AI fueron estadísticamente significativas para la Troponina-I, la IL6 y el BNP.

En un estudio anterior de nuestro grupo, se demostró que pocas horas después del IAM los Mφ de sangre periférica de estos pacientes presentaban un perfil pro-inflamatorio. Sin embargo, al mismo tiempo se producía una elevación significativa de la pseudoquinasa IRAK-M, un regulador negativo de la inflamación.<sup>180</sup> Estos datos sugieren que los Mφ presentarían una respuesta reducida a un estímulo posterior con LPS, fenómeno denominado tolerancia a endotoxinas.<sup>29, 48</sup> Con el fin de estudiar si la inflamación inicial provocada por el IAM da lugar a una posterior polarización hacia una respuesta anti-inflamatoria en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y, específicamente, en los Mφ de sangre periférica, para este nuevo estudio se recogieron muestras de sangre entre 24 y 36 horas (30±6h) después del episodio cardiovascular.

Tabla R1. Comparación demográfica y clínica entre los grupos de pacientes.

	AI (n = 30)	SCAEST (n = 24)	SCACEST (n = 21)	VS (n = 20)	p-valor
Edad (años), X±DE	60,7 ± 8,9	62,4 ± 9,6	61,3 ± 10,6	60,4 ± 10,3	ns
Sexo masculino, n (%)	19 (63%)	16 (67%)	13 (62%)	12 (60%)	ns
Historia previa de C.I., n (%)	2 (7%)	5 (21%)	5 (24%)		
<b>Factores de riesgo cardiovascular, n (%)</b>					
Hipertensión, (>140/90 mm Hg)	11 (37%)	14 (58%)	13 (62%)	0	<0,05
Diabetes mellitus	6 (20%)	12 (50%)	12 (57%)	0	<0,01
Fumador	6 (20%)	6 (25%)	5 (24%)	0	ns
Hipercolesterolemia (>5,17 mmol/L)	8 (27%)	9 (37%)	7 (33%)	0	ns
Historia familiar de C.I.	4 (13%)	4 (17%)	3 (14%)		
Al menos 3 factores de riesgo	3 (10%)	8 (33%)	8 (38%)		
<b>Cateterismo Coronario, (X±DE)</b>					
Vessel score	1,3±0,6	1,6±0,8	2,1 ±0,8		
<b>Datos de laboratorio, (M±DE)</b>					
Leucocitos (x 10 <sup>9</sup> /mL)	8,8±1,75	12,7±2,24	13,1 ±2,48	7,5±1,46	<0,01
Creatinina (μmol/L)	70,4±16,2	71,5 ±14,3	72,4±15,6	69,8±14,7	ns
Glucosa (mmol/L)	5,54±0,94	6,2 ±1,02	6,4 ±1,17	5,30±0,45	<0,05
<b>Seguimiento, n (%)</b>					
Episodios infecciosos en los 3 meses siguientes el alta	0	3 (12%)	4 (19%)		
IAM fatal durante el primer año	0	1 (4%)	1 (5%)		

Vessel score <sup>294</sup>. C.I.: Cardiopatía Isquémica.

Tabla R2. Comparación de los marcadores bioquímicos en sangre en los pacientes con SCA.

	AI (n=29)	SCASEST (n=24)	p-valor SCASEST vs AI	SCACEST (n=21)	p-valor SCACEST vs AI
<b>Troponina-I (ng/ml)</b>	18±10	76±25	<0,001	84±23	<0,001
<b>PCR (mg/dl)</b>	9,54±2,38	10,60±2,10	ns	14,24±5,09	<0,001
<b>IL6 (ng/l)</b>	8,03±2,14	10,75±2,20	<0,001	12,33±2,90	<0,001
<b>BNP (pg/ml)</b>	58±37	364±191	ns	482±255	<0,001

Los valores son  $\bar{X} \pm \text{DE}$ .

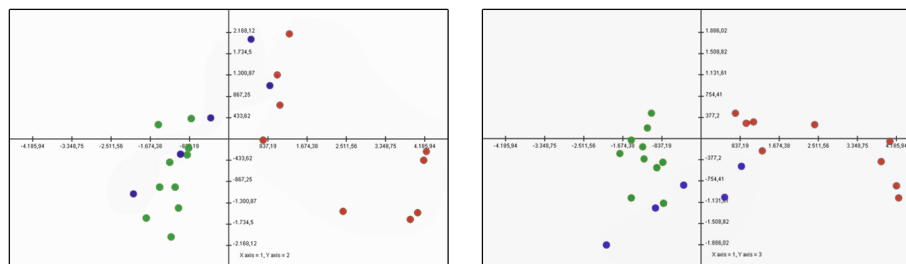
## 4.2 Genes con expresión diferencial en las CMSP entre los pacientes de AI y de SCACEST.

Para comprender mejor los cambios en la expresión génica que se producen en las CMSP después de un IAM, se realizó un análisis de expresión utilizando la plataforma 4x44k de Agilent. Para ello comparamos el ARNm de las CMSP de 14 pacientes que habían sufrido un IAM (5 del grupo SCASEST y 9 del grupo SCACEST) y de 10 pacientes con AI como control sin IAM, elegidos de forma aleatoria entre el total de 75 pacientes. Se utilizaron los pacientes de AI en lugar de VS en la comparación para valorar únicamente los cambios producidos por el IAM, y no por otras alteraciones cardiovasculares, como la hiper-colesterolemia o la diabetes, que son comunes en estos dos grupos pero no así en VS y podrían dificultar el análisis.

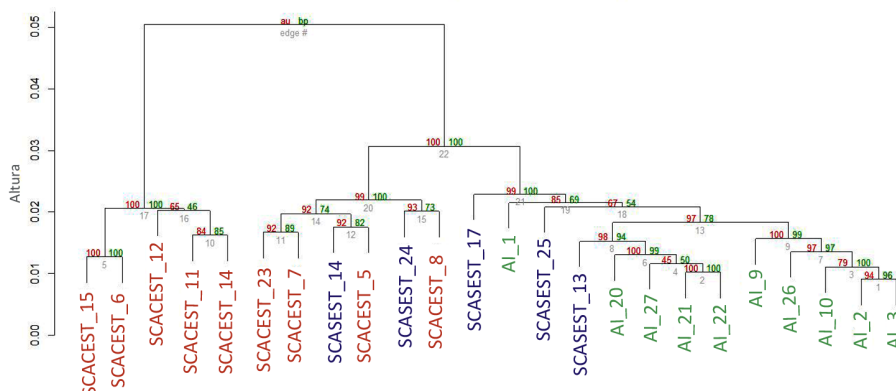
En primer lugar, quisimos comprobar la homogeneidad entre los pacientes de cada grupo mediante un análisis de la agrupación jerárquica y un análisis de componentes principales (ACP). Con el ACP se consigue la representación en pocas dimensiones de todos los valores numéricos de las diferentes muestras estudiadas para facilitarnos la interpretación de los datos. Esta reducción de las dimensiones evidencia relaciones entre los datos que de otra forma estarían enmascaradas. Para realizar estos análisis, decidimos filtrar los datos de manera que pudiésemos trabajar únicamente con aquellos genes cuya expresión diferencial fuese estadísticamente significativa. Para ello, se compararon los tres grupos de pacientes (AI, SCASEST y SCACEST) utilizando el test estadístico ANOVA de una vía y se seleccionaron aquellos genes que presentaban alguna alteración estadísticamente significativa en sus niveles de expresión ( $p < 0.05$ ). Así, se generó un subconjunto filtrado de 5554 genes con el que se realizaron los análisis de componentes



A



B



**Figura R1. Análisis de la clasificación de los pacientes de SCA** en base a los genes expresados diferencialmente ( $p < 0,05$  y cambio medio de expresión  $\geq 1$ ; ANOVA de una vía) para determinar las diferencias y similitudes en los perfiles de expresión de los 3 grupos de pacientes. AI=10 (Verde), SCACEST= 5 (Azul), SCACEST= 9 (Rojo). **A**, Dos visiones del análisis de ACP calculado tomando como variables los 24 pacientes. El primer componente principal incluye el 38,8% de la varianza, el segundo el 12,65% y el tercero el 4,9%. **B**, Análisis Bootstrap con agrupamiento jerárquico de los pacientes (correlación de Pearson, average linkage). Se muestran los valores de bootstrap de 1000 re-muestreos que indican el grado de estabilidad de los agrupamientos: AU: Approximately Unbiased, BP: Bootstrap Probability.

principales y la agrupación jerárquica. Como se puede comprobar en el ACP (Figura R1 A) y la agrupación jerárquica (Figura R1 B), todos los pacientes de AI y de SCACEST quedan agrupados. En el ACP, los pacientes de SCACEST se distribuyen en los dos cuadrantes de la derecha y los pacientes de AI están en los cuadrantes a la izquierda del gráfico, sobre todo en el inferior. Los pacientes de SCACEST por el contrario, están distribuidos a lo largo de tres cuadrantes en cada gráfico en el ACP. El re-muestreo “bootstrap” reveló que los perfiles de expresión de los pacientes de SCACEST y AI apoyan una agrupación separada de ambos grupos (Figura R1 B). La rama principal del dendrograma, que representa un 100% de respaldo estadístico, separa en 2 grupos a los pacientes de SCACEST, por un lado 5 pacientes de SCACEST y por otro 4 pacientes de SCACEST que agrupan con 2 de SCACEST. Además, los pacientes de AI quedan separados de este grupo mixto y del conjunto del grupo SCACEST por una rama con un 100% de apoyo estadístico. Por tanto, los pacientes de SCACEST aparecen dispersos entre los grupos de AI y de

SCACEST en la agrupación jerárquica (Figura R1 B), indicando que dentro de este grupo hay una gran heterogeneidad en la expresión génica y que tienen un perfil de expresión similar a los otros dos grupos dependiendo de cada paciente. Por ello, para los estudios posteriores de análisis funcionales basados en la expresión génica, se decidió comparar solamente los pacientes de los grupos AI y SCACEST, ya que incluir los pacientes de SCACEST podría dificultar el análisis.

Utilizando el test *limma*,<sup>285</sup> comparamos los niveles de expresión de los genes entre los grupos de pacientes de AI y SCACEST. De todos los genes con un p-valor < 0,05 y un cambio medio de expresión  $\geq 1$ , se encontraron 215 genes sobre-expresados y 107 con expresión disminuida en SCACEST comparado con el grupo AI (Tablas A1 y A2). En las Tablas R3 y R4 se muestran los 10 genes con mayor y menor expresión en los pacientes con SCACEST, respectivamente.

Entre los genes con mayor expresión, hay genes implicados en la patogénesis de la aterosclerosis, como el receptor de las lipoproteínas oxidadas de baja densidad (LOX-1) codificado por el gen OLR1,<sup>127</sup> o en regular la respuesta inflamatoria como WNT5A<sup>110</sup> o PTGES.<sup>36</sup> Además de los genes sobre-expresados, el análisis mostró algunos genes con expresión disminuida en los pacientes con SCACEST comparado con los pacientes con AI (Tabla R4). Entre ellos destacan un gen diana de p53 que regula la autofagia, AEN<sup>78</sup>, el gen RAD18<sup>131</sup>, implicado en la señalización en respuesta al daño en el ADN, o la IL4, característica de la respuesta Th2 de linfocitos.

**Tabla R3. Los 10 genes con mayor sobre-expresión en las CMSP de pacientes de SCACEST comparado con pacientes de AI.**

Símbolo	Nº de veces del cambio	Descripción
OLR1	3,894	receptor de las lipoproteínas oxidadas de baja densidad 1
ANGPTL4	3,391	similar a <i>angiopoyetina - 4</i>
MLXIPL	3,031	proteína de interacción tipo MLX
PTGES	2,986	prostaglandina E sintasa
WNT5A	2,963	miembro 5A de la familia wingless-type MMTV
SYN1	2,819	sinapsina I
A4GALT	2,722	alfa 1,4-galactosiltransferasa
SEMA6B	2,708	semaforina 6B
FN1	2,6	fibronectina 1
SERPINE1	2,333	Inhibidor de la peptidasa serpina, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), miembro 1

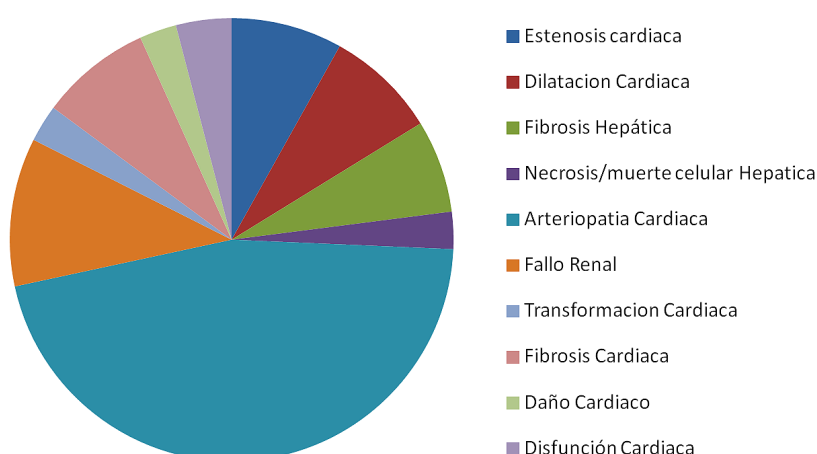
**Tabla R4. Los 10 genes con menor expresión en las CMSP de pacientes de SCACEST comparado con pacientes de AI.**

Símbolo	Nº de veces del cambio	Descripción
CLTC	-2,324	clatrina, cadena pesada
ARPP19	-2,126	fosfoproteína regulada por cAMP, 19kDa
AEN	-1,859	nucleasa, apoptosis enhancing nuclease
CLEC4F	-1,7	C-type lectin domain family 4, member F
IL4	-1,614	interleuquina 4
RAD18	-1,59	Homólogo de RAD18 ( <i>S. cerevisiae</i> )
MS4A2	-1,584	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2 (Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; beta polypeptide)
RPL22	-1,564	proteína ribosomal L22
NPTN	-1,545	neuroplastina
RHOD	-1,528	homologo de la familia de ras, miembro D

## 4.3. Efectos adversos de los genes expresados diferencialmente en las CMSP de los pacientes de SCACEST.

La interpretación biológica de los datos obtenidos mediante el estudio de expresión génica requiere un análisis funcional de las proteínas para las que codifican los genes expresados diferencialmente. Para realizar este análisis se utilizó el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA) partiendo de la tabla de genes diferencialmente expresados en las CMSP de pacientes de SCACEST comparado con AI, con un p-valor <0,05 y un cambio medio de expresión  $\geq 1$ . Este programa identifica los efectos nocivos que tendrán los diferentes grupos de genes estudiados, así como las principales funciones y vías de señalización afectadas, apoyándose en una base de datos muy potente y en constante actualización. Los detalles del análisis se especifican en la sección 3.16.5.

El análisis de los efectos que tendrán los genes expresados diferencialmente ha de reflejar las diferencias en las patologías entre AI y los pacientes que han sufrido un IAM (SCACEST). En consecuencia, entre los 10 efectos más significativos encontramos la arteriopatía cardiaca asociada al mayor número de genes expresados diferencialmente (Figura R2). Seguidamente



**Figura R2. Principales efectos adversos** asociados al conjunto de genes expresados diferencialmente en las CMSP de los pacientes de SCACEST, calculado con el programa IPA y representados en función del número de genes asociados a ese efecto.

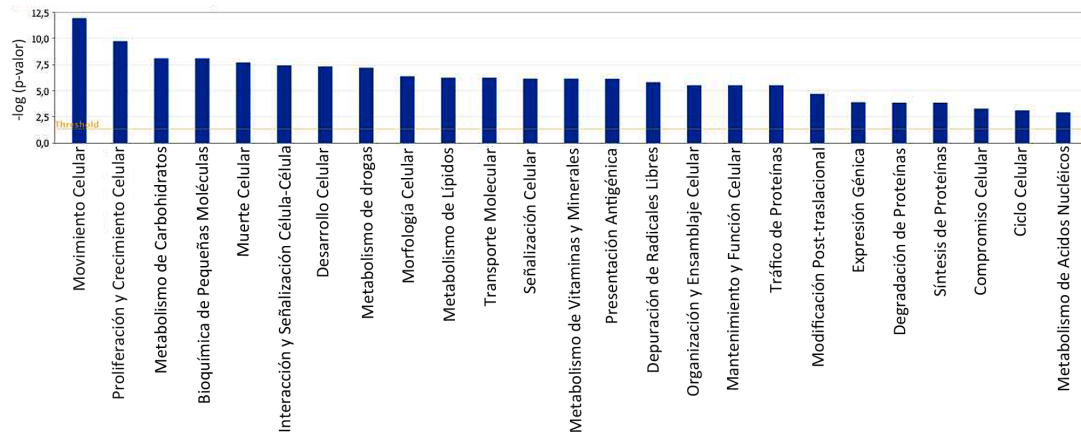
tenemos la estenosis cardiaca, la dilatación y el daño del corazón. Estos resultados concuerdan con la mayor severidad de la enfermedad coronaria en los pacientes de SCACEST. Cabe indicar que el análisis arrojó posibles efectos adversos en otros órganos como el hígado o el riñón.

#### 4.4. Análisis funcional de los genes diferencialmente regulados en las CMSP de SCACEST comparado con AI.

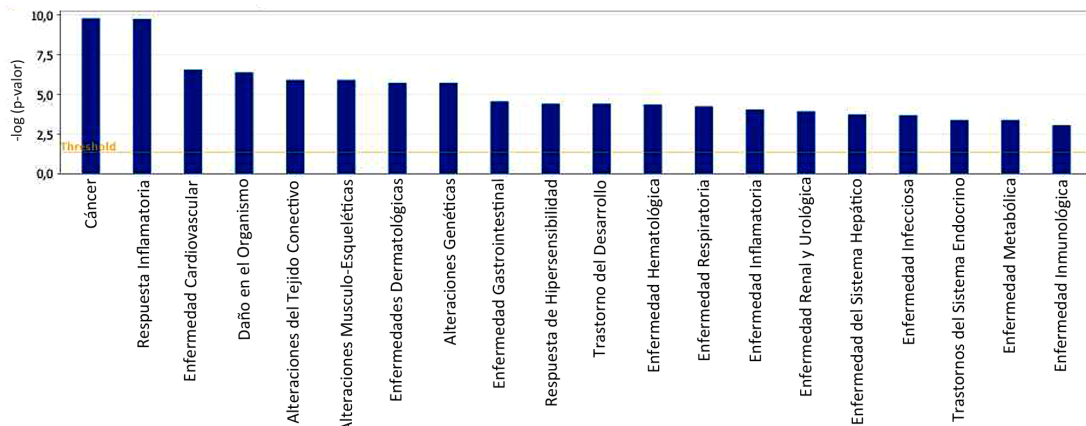
Para profundizar en el análisis de las alteraciones del perfil de expresión génica provocadas por el IAM, se estudiaron con el programa IPA las funciones que podrían estar afectadas en la CMSP de estos pacientes. El análisis IPA asocia cada gen a las funciones basándose en la literatura científica, y clasifica las funciones afectadas en base al p-valor, el nivel de expresión y en el número de genes que aparecen en cada categoría funcional. El análisis IPA identificó 70 funciones significativamente afectadas, todas ellas se muestran en la Figura R3, en relación al p-valor y separadas por categorías. En la Tabla R5 se muestran los cambios de expresión de los genes asociados a las 5 funciones principales de cada categoría.

Con este análisis hallamos que las más afectadas en la categoría de Funciones Moleculares y Celulares eran el movimiento y la proliferación celular, el metabolismo de carbohidratos, la biosíntesis de pequeñas moléculas y la muerte celular (Figura R3 A y Tabla R5). Entre las 20 enfermedades que se asocian significativamente con nuestro conjunto de genes en la categoría de Enfermedades y Trastornos el cáncer aparece como la más significativa. Como era de esperar, otras de las más afectadas eran las enfermedades cardiovasculares, con sobre-expresión de la mayoría de los genes implicados (Figura R3 B y Tabla R5). Cabe destacar que la respuesta inflamatoria también estaba entre las funciones más afectadas en los pacientes con SCACEST.

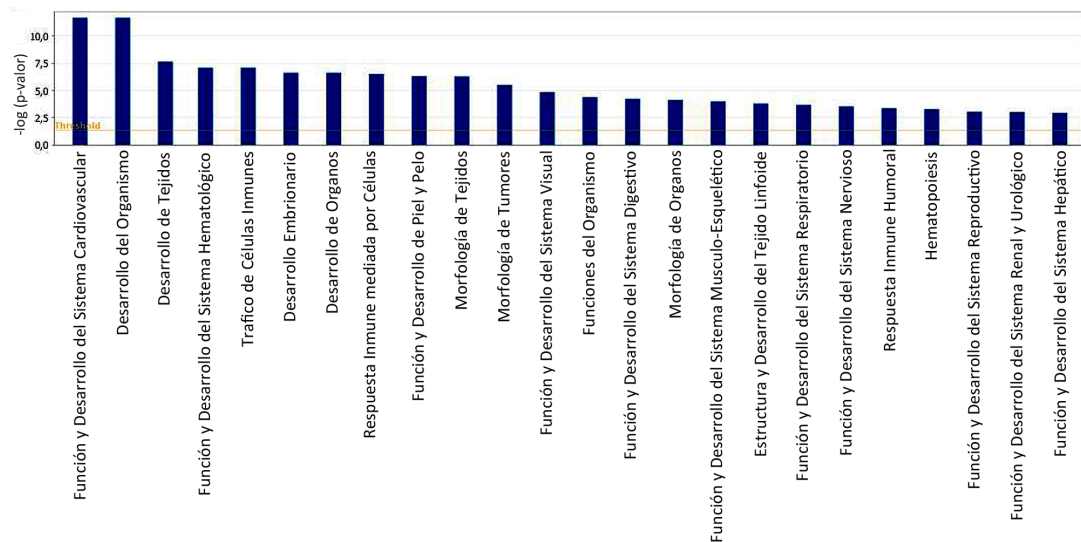
## Funciones Moleculares y Celulares



## Enfermedades y trastornos



## Desarrollo y Función del Sistema Fisiológico



© 2000–2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

**Figura R3. Análisis funcional con Ingenuity Pathway Analysis.** Principales funciones asociadas al conjunto de genes expresados diferencialmente en CMSP de los pacientes de SCACEST, separado por categorías. Se utilizó el test exacto de Fischer para calcular el p-valor para cada función (representado como  $-\log(p\text{-valor})$ ). La línea amarilla Threshold representa un p-valor de 0,05.

Entre los 40 genes sobre-expresados en esta categoría, encontramos genes pro-inflamatorios, como IL8 y CCL20, anti-inflamatorios como IL10, factores pro-angiogénicos como VEGFA o modificadores de la matriz extracelular (MMP14 y MMP2). Por otra parte, entre los 16 genes asociados a la respuesta inflamatoria que tienen expresión disminuida en SCACEST encontramos la IL4, la citoquina pro-inflamatoria CXCL9 o el receptor de células NK NCR3 (Tabla R5).

Dentro de la categoría de Desarrollo y Función del Sistema Fisiológico, al igual que en el resto de categorías, las más significativamente afectadas están relacionadas con el sistema cardiovascular, como la función y desarrollo del sistema cardiovascular o el desarrollo del sistema hematopoyético, (Figura R3 C y Tabla R5).

**Tabla R5. Principales funciones afectadas en las CMSP de los pacientes de SCACEST comparado con AI, identificadas mediante el análisis del el programa IPA entre los genes diferencialmente regulados.**

Categoría	Función	p-valor	# Genes	Genes sobre-expresados	Genes disminuidos
Funciones Moleculares y Celulares	Movimiento Celular	1,15E-12 - 1,25E-03	72	OLR1, ANGPTL4, PTGES, WNT5A, A4GALT, FN1, SERPINE1, SERPINB2, IL8, CST6, TGM2, IL10, CCL20, CXCR7, LGMN, CTNND1, HAS1, UNC5B, DDR2, ENG, SNAI1, VEGFA, VASH1, SPP1, DOCK4, PPARG, FURIN, TRH, MARCKSL1, TGFA, ARHGAP8/PRR5-ARHGAP8, OSM, MRC2, IER3, BCAR3, CXCL2, PLAUI, PPAP2B, PDE2A, ACTB, LIMK2, MSR1, CYP1B1, ADORA3, VAV2, EDNRB, THBS1, MCAM, SKI, MFI2, MMP14, ITGA9, MMP2, FCAR, MYO10, NOTCH1, AKT3, JUN, ATF3, SCN1B	IL4, RHOD, NTN4, CXCL9, LCP1, CYP2J2, IL32, FCER1A, LIPA, ST6GAL1, MYH11, MDGA1
	Proliferación y Crecimiento Celular	1,83E-10 - 1,25E-03	106	ANGPTL4, MLXIPL, PTGES, WNT5A, FN1, SERPINE1, SERPINB2, IL8, CST6, TGM2, PMEPA1, IL10, ADRA2B, SMAD6, CCL20, CXCR7, PVRL4, LGMN, COL8A2, CTNND1, HAS1, UNC5B, CTAG1B (includes others), DDR2, ENG, VEGFA, VASH1, GPX3, SPP1, BRIP1, DOCK4, PPARG, BCAT1, REM2, FURIN, ANLN, TRH, MARCKSL1, FOSB, TGFA, OSM, IER3, BCAR3, CXCL2, CUX1, NUPR1, PLAUI, SKIL, CAMK2A, PRG2, ACTB, MSR1, CYP1B1, TNFAIP6, ADORA3, VAV2, EDNRB, THBS1, MCAM, PLCD3	CLTC, IL4, MS4A2, CLC, VPREB1, NTN4, GCAT, CXCL9, LCP1, GZMK, NCR3, PRKAR2B, CYP2J2, MRAP, MLLT3, IFNE, CBX7, ADAR, TXNRD1, YAP1, HSD11B1, IL34, IL32, FCER1A, EIF4B, LIPA, SSR1, ST6GAL1, PRDX2, MYH11, ENPP3, LAG3

Categoría	Función	p-valor	# Genes	Genes sobre-expresados	Genes disminuidos
	<b>Metabolismo de Carbohidratos</b>	8,15E-09 - 1,25E-03	22	FN1, NCS1, FUT3, IL8, IL10, IL1R2, HAS1, VEGFA, SPP1, PPARG, TRH, OSM, DSE, PLAUI, TNFAIP6, ADORA3, THBS1, MMP14, P2RY6, MMP2	IL4, TKTL1
	<b>Bioquímica de Pequeñas Moléculas</b>	8,15E-09 - 1,25E-03	52	OLR1, ANGPTL4, MLXIPL, PTGES, WNT5A, A4GALT, FN1, SERPINE1, RDH12, NCS1, IL8, IL10, IL1R2, APOC2, VEGFA, SPP1, PPARG, TRH, LPCAT1, TGFA, OSM, TRPV4, APOC1, CUX1, PLAUI, PPAP2B, PRG2, MSR1, CYP1B1, TNFAIP6, ADORA3, EDNRB, THBS1, MMP14, P2RY6, MMP2, NOSTRIN, NOTCH1, JUN, ATF3, RGS16	IL4, MS4A2, PRKAR2B, CYP2J2, IFNE, ACOT4, TXNRD1, HSD11B1, IL32, FCER1A, LIPA
	<b>Muerte Celular</b>	2,01E-08 - 1,18E-03	81	OLR1, PTGES, WNT5A, A4GALT, FN1, SERPINE1, SERPINB2, NCS1, IL8, TGM2, PMEP1, IL10, SMAD6, CXCR7, UNC5B, SNAI1, VEGFA, SPP1, PPARG, TRH, FOSB, TGFA, SERPINB10, HSPA2, OSM, IER3, CXCL2, NUPR1, PLAUI, SKIL, PRG2, ACTB, DAPK1, MSR1, CYP1B1, ADORA3, VAV2, EDNRB, THBS1, MCAM, PPP1R14D, SKI, PIWIL2, MMP14, MMP2, RAI14, MERTK, FCAR, AATK, NOTCH1, PPIF, TMEM57, AKT3, JUN, ATF3, RGS16	AEN, IL4, RAD18, MS4A2, NTN4, CXCL9, GPM6A, GZMK, NCR3, PRKAR2B, CYP2J2, MLLT3, IFNE, ADAR, TXNRD1, IL32, FCER1A, ST6GAL1, PPFIA4, PRDX2, MYH11, NUP43, RCAN2, LAG3, PARVA
<b>Enfermedades y trastornos</b>	<b>Cáncer</b>	1,57E-10 - 1,20E-03	115	OLR1, ANGPTL4, PTGES, WNT5A, SEMA6B, FN1, SERPINE1, RDH12, SERPINB2, FUT3, IL8, C15orf48, CST6, TGM2, FAM3B, IL10, ADRA2B, CXCR7, PVRL4, CNDP1, NKD1, SMC4, CTNND1, AMPH, CTAG1B (includes others), BAGE4, DDR2, ENG, SNAI1, SCN4B, VEGFA, VASH1, GPX3, SPP1, BRIP1, PPARG, BCAT1, FURIN, DACT3, ANLN, FOSB, TGFA, ARHGAP8/PRR5-ARHGAP8, OSM, IER3, KRT20, CXCL2, APOC1, MTHFD1L, HIC1, CUX1, NUPR1, PLAUI, SKIL, PPAP2B, PDE2A, ACTB, ATP6V1B1, NLGN3, SLC2A3, DAPK1, MSR1, TNNT3, CYP1B1, CHRNA4, ADORA3, MFAP4, EDNRB, THBS1, TLE3, MCAM, SKI, PIWIL2, MFI2, MMP14, ITGA9, P2RY6, MMP2, MERTK, PDS5B, LOC157627, NOTCH1, AKT3, JUN, RGS16, ATF3, SCN1B	CLTC, IL4, RPL22, CLC, NTN4, DSC1, GCAT, GPM6B, CXCL9, CSTF3, GPM6A, GZMK, NLRP7, HIST1H2BD, MLLT3, CBX7, MAF, HSD11B1, IL32, FCER1A, EIF4B, PRDX2, MYH11, RAB31, NUP43, RCAN2, CYP2A6 (includes others), LAG3

Categoría	Función	p-valor	# Genes	Genes sobre-expresados	Genes disminuidos
	<b>Respuesta Inflamatoria</b>	1,70E-10 - 1,09E-03	56	OLR1, PTGES, WNT5A, FN1, SERPINE1, IL8, CST6, TGM2, IL10, SMAD6, CCL20, CXCR7, IL1R2, UNC5B, AMPH, CTAG1B (includes others), VEGFA, SPP1, PPARG, TPST1, OSM, IER3, CXCL2, NUPR1, PLAUI, PRG2, MSR1, TNFAIP6, ADORA3, VAV2, EDNRB, THBS1, MCAM, MMP14, P2RY6, MMP2, MERTK, FCAR, NOTCH1, ATF3	IL4, MS4A2, CLC, VPREB1, DSC1, CXCL9, LCP1, NCR3, IFNE, MAF, IL32, FCER1A, LIPA, ST6GAL1, PRDX2, LAG3
	<b>Enfermedad Cardiovascular</b>	2,75E-07 - 1,25E-03	73	OLR1, MLXIPL, PTGES, SERPINE1, IL8, PMEPA1, IL10, ADRA2B, RBM47, CNDP1, NKD1, LGMN, APOC2, AMPH, DDR2, ENG, VEGFA, SPP1, DOCK4, PPARG, BCAT1, FURIN, MARCKSL1, FOSB, TGFA, ARHGAP8/PRR5-ARHGAP8, TRPV4, APOC1, SLC25A37, MTHFD1L, CUX1, PLAUI, CAMKK1, MSR1, TNFAIP6, CHRN4, SLC16A6, ADORA3, VAV2, GTF2IRD1, EDNRB, THBS1, FAM176A, LOC283143, ADCY4, MMP14, SIAH3, P2RY6, MMP2, MERTK, PDS5B, MYO10, GJB6, NOTCH1, PPIF, AKT3, PHACTR1, JUN, SCN1B	CLEC4F, IL4, NPTN, GPM6A, YAP1, HSD11B1, IL32, CPA3, EIF4B, KIAA1324, MYH11, RAB31, MDGA1, PARVA
	<b>Daño en el Organismo</b>	4,12E-07 - 7,88E-04	40	OLR1, MLXIPL, PTGES, WNT5A, FN1, SERPINE1, IL8, TGM2, IL10, ADRA2B, SMAD6, IL1R2, UNC5B, ENG, VEGFA, SPP1, PPARG, FURIN, TGFA, OSM, TRPV4, NUPR1, PLAUI, PRG2, MSR1, TNFAIP6, ADORA3, VAV2, GTF2IRD1, EDNRB, THBS1, MMP14, MMP2, GJB6, NOTCH1, ATF3	IL4, CXCL9, CYP2J2, IL32
	<b>Alteraciones del Tejido Conectivo</b>	1,24E-06 - 1,15E-03	15	FN1, SERPINB2, IL8, IL10, VEGFA, SPP1, TGFA, OSM, PLAUI, TNFAIP6, THBS1, MMP2	IL4, LCP1, IL32
<b>Desarrollo y Función del Sistema Fisiológico</b>	<b>Función y Desarrollo del Sistema Cardiovascular</b>	2,12E-12 - 1,23E-03	49	OLR1, ANGPTL4, PTGES, WNT5A, FN1, SERPINE1, IL8, TGM2, IL10, ADRA2B, UNC5B, ENG, VEGFA, VASH1, SPP1, PPARG, REM2, FURIN, TRH, MARCKSL1, TGFA, OSM, TRPV4, CXCL2, NUPR1, PLAUI, PPAP2B, PDE2A, CYP1B1, VAV2, EDNRB, THBS1, PLCD3, MFI2, MMP14, ITGA9, SPRY1, MMP2, NOTCH1, JUN, ATF3	IL4, NTN4, CXCL9, CYP2J2, OGT, YAP1, HSD11B1, MYH11



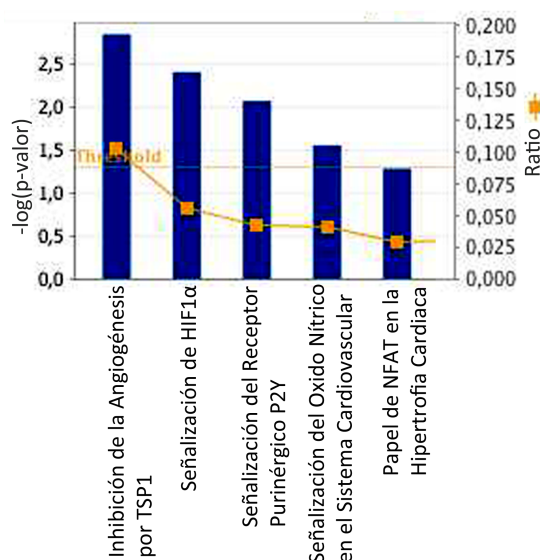
Categoría	Función	p-valor	# Genes	Genes sobre-expresados	Genes disminuidos
	<b>Desarrollo del Organismo</b>	2,12E-12 - 1,25E-03	71	OLR1, ANGPTL4, PTGES, WNT5A, FN1, SERPINE1, IL8, CST6, TGM2, IL10, ADRA2B, COL8A2, CTNND1, UNC5B, ENG, SNAI1, VEGFA, VASH1, SPP1, PPARG, REM2, FURIN, MARCKSL1, FOSB, TGFA, HSPA2, TPST1, OSM, KCNQ4, DSE, CXCL2, APOC1, CUX1, PLAUI, PPAP2B, PDE2A, ATP6V1B1, LIMK2, MSR1, CYP1B1, EDNRB, THBS1, TLE3, PLCD3, SKI, PIWIL2, MMP14, ITGA9, SPRY1, MMP2, MERTK, GJB6, NOTCH1, JUN, ATF3	IL4, RAD18, RPL22, NTN4, BAZ1B, PRKAR2B, OGT, MAF, SLC23A1, YAP1, HSD11B1, LIPA, PRDX2, MYH11, MDGA1, TLE2
	<b>Desarrollo de Tejidos</b>	2,29E-08 - 1,25E-03	87	OLR1, ANGPTL4, PTGES, WNT5A, FN1, SERPINE1, SERPINB2, IL8, CST6 (includes EG:1474), TGM2, IL10, ADRA2B, SMAD6, CCL20, COL8A2, CTNND1, ENG, SNAI1, SCN4B, VEGFA, VASH1, SPP1 (includes EG:20750), PPARG, REM2, FURIN, MARCKSL1, FOSB, TGFA, HSPA2, OSM, KCNQ4, DSE, IER3, CXCL2, CUX1, PLAUI, SKIL, PPAP2B, CAMK2A, ACTB, ATP6V1B1, LIMK2, MSR1 (includes EG:20288), CYP1B1, EDNRB, THBS1, TLE3, SKI, PIWIL2, MMP14, ITGA9, P2RY6, SPRY1, MMP2, MERTK, FCAR, BMP2K, GJB6, NOTCH1, JUN, ATF3	IL4, RAD18, RPL22, RHOD, NTN4, DSC1, CXCL9, BAZ1B, LCP1, PRKAR2B, CYP2J2, OGT, MAF, ADAR, SLC23A1, TXNRD1, YAP1, HSD11B1, IL32, ADAM22, LIPA, ST6GAL1, PRDX2, MYH11, MDGA1, TLE2
	<b>Función y Desarrollo del Sistema Hematológico</b>	8,24E-08 - 1,25E-03	52	OLR1, PTGES, WNT5A, FN1, SERPINE1, IL8, TGM2, IL10, CCL20, CXCR7, UNC5B, CTAG1B (includes others), ENG, VEGFA, SPP1, PPARG, FOSB, OSM, IER3, CXCL2, PLAUI, PRG2, MSR1, ADORA3, VAV2, EDNRB, THBS1, MCAM, PIWIL2, MMP14, MMP2, MERTK, FCAR, NOTCH1, ATF3	IL4, RHOD, CLC, VPREB1, DSC1, CXCL9, LCP1, NCR3, IFNE, MAF, IL32, FCER1A, LIPA, ST6GAL1, PRDX2, MYH11, LAG3
	<b>Tráfico de Células del Sistema Inmune</b>	8,24E-08 - 1,25E-03	46	OLR1, PTGES, WNT5A, FN1, SERPINE1, IL8, TGM2, IL10, CCL20, CXCR7, UNC5B, CTAG1B (includes others), VEGFA, SPP1, PPARG, OSM, IER3, CXCL2, PLAUI, PRG2, MSR1, ADORA3, VAV2, EDNRB, THBS1, MCAM, MMP14, ITGA9, MMP2, MERTK, FCAR, NOTCH1	IL4, RHOD, CLC, DSC1, CXCL9, LCP1, NCR3, IFNE, MAF, FCER1A, LIPA, ST6GAL1, PRDX2, LAG3

\*Los criterios aplicados para la búsqueda de las principales categorías funcionales fueron el máximo número de genes y el p-valor. Se consideraron significativos los rangos del p-valor entre  $2,12 \times 10^{-12}$  y  $1,09 \times 10^{-3}$ . Los genes están ordenados de menor a mayor expresión.

## 4.4.1. Alteraciones post-IAM en la función y el desarrollo del sistema cardiovascular.

La reconstrucción de rutas de señalización constituye una herramienta muy útil a la hora de analizar perfiles de expresión génica.<sup>311</sup> Con el programa IPA podemos conocer las rutas de señalización en las que participan los genes expresados diferencialmente basándose en la literatura científica y calculando la probabilidad de que una ruta determinada esté asociada a los genes únicamente por azar. Para profundizar en las vías de señalización afectadas, los genes implicados y su regulación nos centramos en las categorías funcionales asociadas al sistema cardiovascular, así como a la respuesta del sistema inmune.

Como primer paso analizamos los efectos sobre la función y el desarrollo del sistema cardiovascular para comprobar que, efectivamente, el análisis *in silico* del perfil génico es capaz de detectar las diferencias clínicas existentes entre los pacientes de SCACEST y AI. En primer lugar analizamos las vías de señalización significativas. Para nuestro conjunto de genes identificamos 5 implicadas en el sistema cardiovascular (Figura R4 y Tabla R6). Estaban alteradas, entre otras, rutas relacionadas con la hipoxia, tales como la vía de la inhibición de la angiogénesis por la Trombospondina 1 (TSP1) y la señalización de HIF1 $\alpha$  (del inglés Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ ).



© 2000–2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

**Figura R4. Rutas de señalización relacionadas con el Sistema Cardiovascular** asociadas al conjunto de genes expresados diferencialmente en CMSP de los pacientes de SCACEST, calculado con el programa IPA. Cada barra azul representa una ruta, la altura de la barra es el  $-\log(p\text{-valor})$  calculado con el test exacto de Fischer. La línea amarilla Threshold es el  $p\text{-valor} = 0,05$ . El ratio (cuadrados amarillos) representa la proporción de nuestro conjunto de genes que participan en la ruta, frente al número total de genes para esa ruta en la base de datos de IPA.

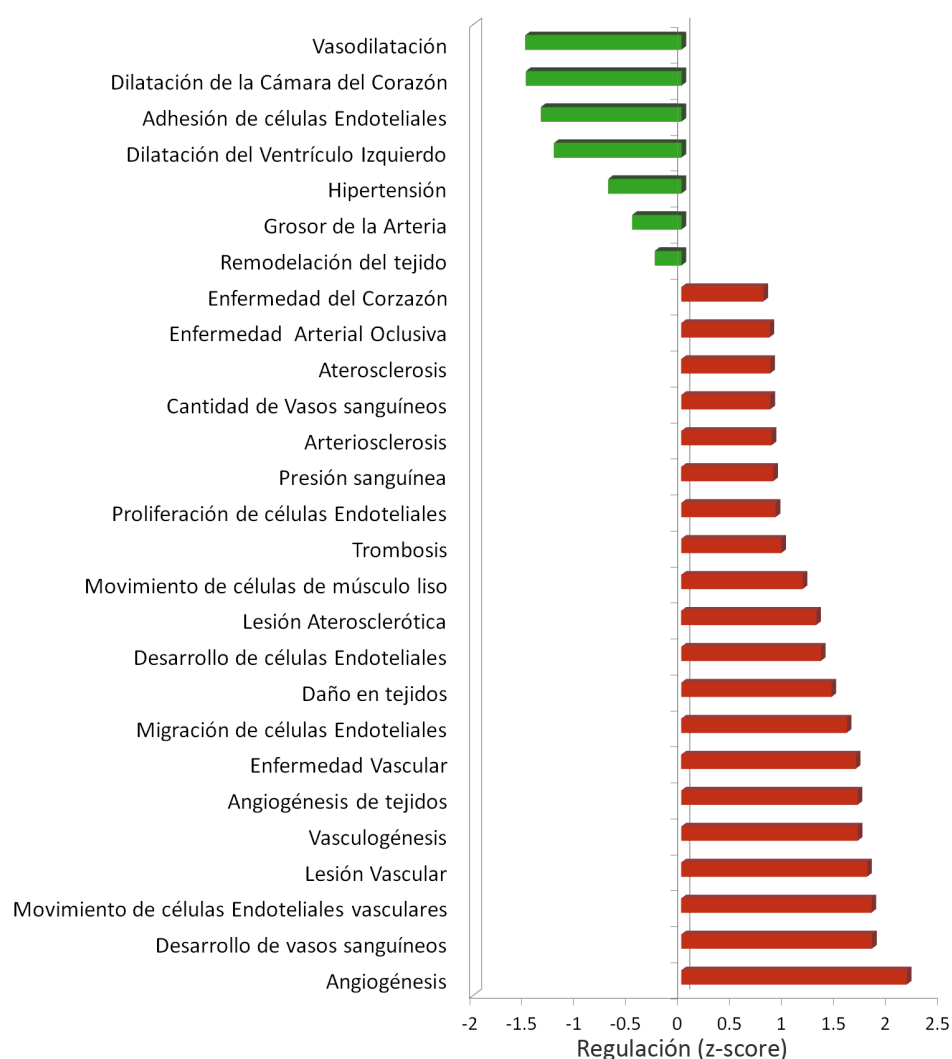
A continuación, quisimos estudiar la regulación de las funciones alteradas detectadas en el análisis previo. Dado que solamente con la dirección de expresión no es posible conocer si los genes afectarán positiva o negativamente a un proceso, para estudiar la posible regulación utilizamos el estadístico z-score. El programa IPA, en base a estudios previos publicados en revistas revisadas por expertos determina cómo afectará cada gen al proceso según esté sobre-expresado o disminuido en nuestro conjunto de datos, y le asigna un z-score. El z-score indica la significación del cambio de expresión, la función se considera aumentada si el z-score es positivo (en rojo) y disminuida si el z-score es negativo (en verde), comparado con la previsión al azar.

En la Figura R5 se muestran las funciones asociadas al sistema cardiovascular en relación a la regulación de cada función, calculada en base al z-score. Así, la predicción es que los procesos con mayor aumento en las CMSP de los pacientes de SCACEST comparado con los pacientes con AI son la angiogénesis, las lesiones vasculares o el movimiento de células endoteliales, y con menor aumento estarían la vasodilatación o la dilatación de la cámara del corazón (Figura R5, Tabla A3). Comprobamos por ejemplo que la angiogénesis estaría aumentada en pacientes con SCACEST (z-score 2,166) porque 18 de los 28 genes implicados en la angiogénesis tienen un sentido de su expresión consistente con un aumento en la angiogénesis, según lo descrito en la literatura científica (Tabla A3). Por el contrario, la dilatación de la cámara del corazón disminuiría en SCACEST puesto que 5 de los 7 genes implicados en este proceso tienen un sentido en su expresión que, en base a estudios previos, disminuiría la dilatación (Figura R5, Tabla A4).

**Tabla R6. Vías de señalización relacionadas con el sistema cardiovascular afectadas en los pacientes de SCACEST.**

Vías de Señalización de Ingenuity	-log (p-valor)	Ratio	Genes
Inhibición de la Angiogénesis por TSP1	2,84E00	1,03E-01	VEGFA, JUN, THBS1, AKT3
Señalización de HIF1 $\alpha$	2,4E00	5,56E-02	VEGFA, JUN, MMP14, AKT3 , MMP2, SLC2A3
Vía de señalización del Receptor Purinérgico P2 $\gamma$	2,06E00	4,29E-02	PLCD3, JUN, PRKAR2B, P2RY6, ADCY4, AKT3
Señalización del óxido Nítrico en el Sistema Cardiovascular	1,55E00	4,00E-02	VEGFA, PDE2A, PRKAR2B, AKT3
Papel de NFAT en la Hipertrofia Cardíaca	1,27E00	2,84E-02	PLCD3, PRKAR2B, CAMK2A, ADCY4, RCAN2, AKT3

La ratio se calcula con el número de genes diferencialmente expresados que participan en la vía de señalización, dividido por el número total de genes en esa vía, según la base de datos del programa IPA. La significación estadística se calculó utilizando el test exacto de Fisher y se representa como  $-\log(p\text{-valor})$ .



**Figura R5. Funciones relacionadas con el Sistema Cardiovascular.** Representación de las funciones relacionadas con el sistema cardiovascular significativamente asociadas al conjunto de genes expresados diferencialmente en CMSP de los pacientes de SCACEST, calculado con el programa IPA. El eje X muestra el z-score para cada grupo ontológico, que predice una regulación positiva (rojo) o negativa (verde) para los genes asociados a esa función.

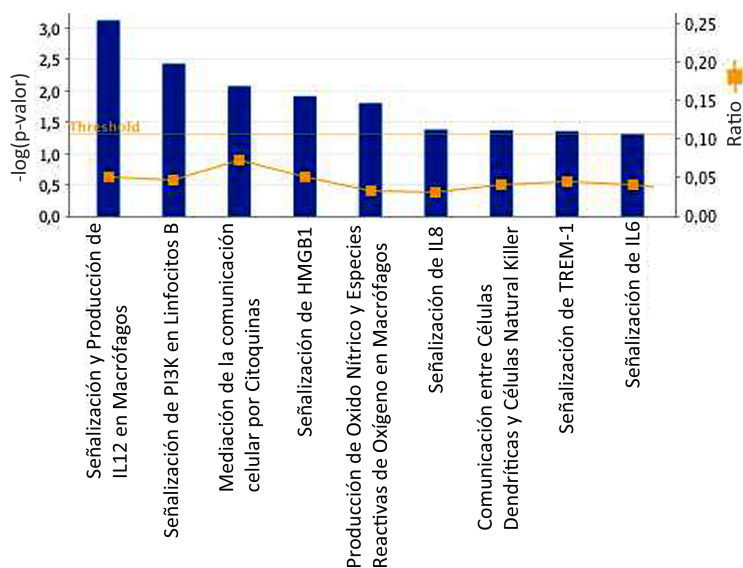
Para algunos procesos, como la arteriosclerosis, la estenosis, la isquemia del miocardio o la enfermedad de la arteria coronaria, no se pudo calcular el z-score ya que tan sólo en algunos genes se conoce en los estudios hasta la fecha si aumentan o disminuyen el proceso (Tabla A5).

En conjunto, los resultados del análisis IPA centrado en el sistema cardiovascular identifican numerosos genes diferencialmente expresados en SCACEST asociados a una mayor aterosclerosis y una mayor lesión en los vasos (Tabla A3). Teniendo en cuenta que los pacientes de SCACEST tienen mayor número de lesiones coronarias y más estenosis que los pacientes de AI (Tabla R1), los resultados obtenidos validan el uso del análisis *in silico* del perfil de expresión para la comparación entre los pacientes con IAM (SCACEST) y los pacientes de AI.

## 4.4.2. Evidencia de la inflamación post-IAM en el análisis funcional de expresión génica.

A continuación analizamos el efecto del IAM en la respuesta inmune de las CMSP. En estudios previos se demuestra que después del IAM se produce inflamación sistémica.<sup>280</sup> Por ello, quisimos analizar en detalle los procesos y vías de señalización asociados a la respuesta inmune que podrían estar siendo afectadas por los genes diferencialmente expresados en las CMSP de los pacientes de SCACEST.

En este contexto, el análisis IPA identificó diversos procesos afectados relacionados con la inflamación y la infección. Entre las vías con afectación más significativa, encontramos las de señalización y producción de IL12 en macrófagos, la señalización de PI3K en los linfocitos B y vías de citoquinas implicadas en mediar la comunicación entre células (Figura R6 y Tabla R7). Es interesante destacar que también aparece la vía de señalización de HMGB1, una proteína DAMP prototípica.<sup>124</sup> A continuación, se representaron los procesos alterados asociados a la respuesta del sistema inmune respecto al z-score para determinar su regulación (Figura R7).



© 2000–2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

**Figura R6. Vías de señalización relacionadas con el Sistema Inmune** asociadas a los genes expresados diferencialmente en las CMSP de los pacientes de SCACEST, calculado con el programa IPA. Cada barra azul representa una ruta, la altura de la barra es el  $-\log(p\text{-valor})$  calculado con el test exacto de Fischer. La línea amarilla Threshold es el  $p\text{-valor}=0,05$ . El ratio (cuadrados amarillos) es la proporción de nuestro conjunto de genes que participan en la ruta, frente al número total de genes para esa ruta de la base de datos IPA.

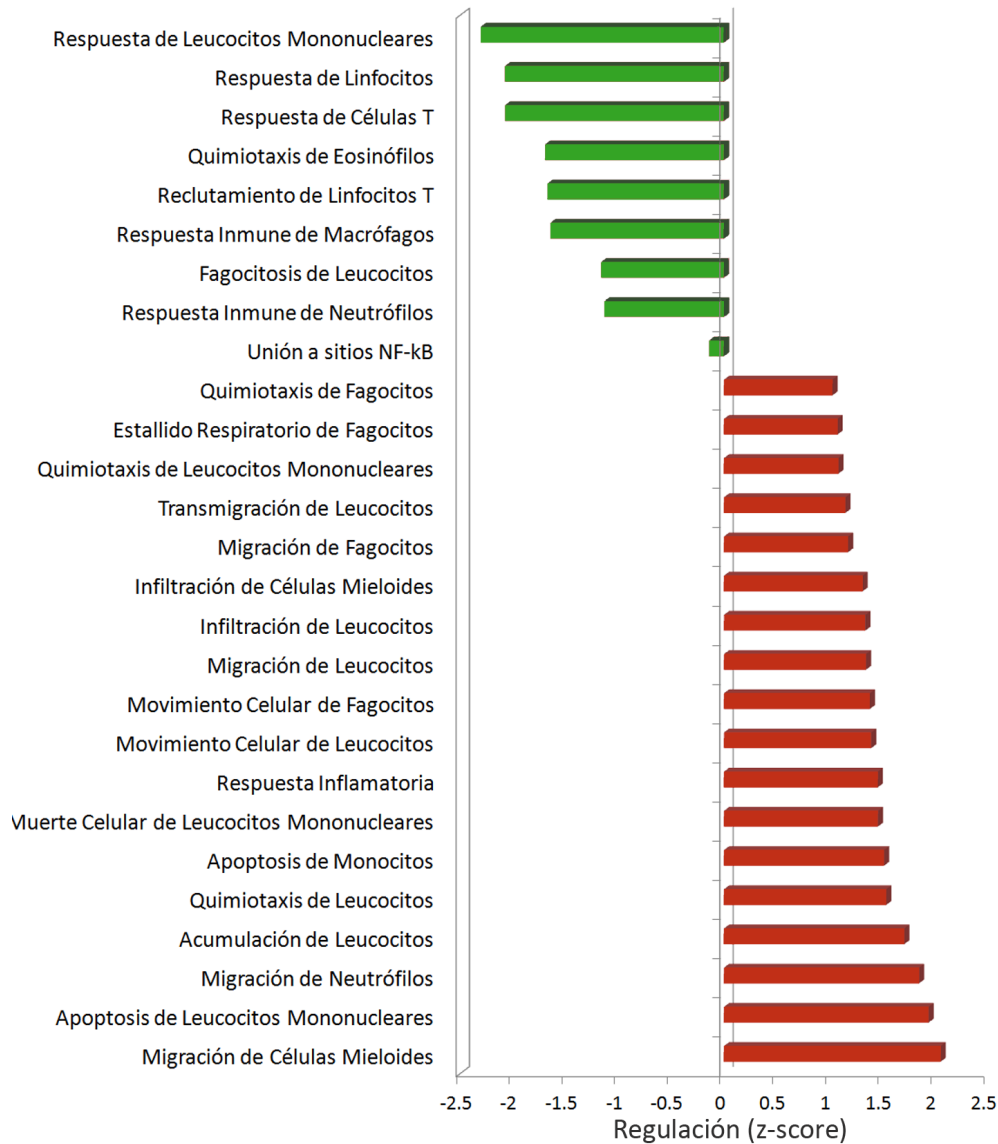
De los resultados obtenidos, identificamos la quimiotaxis, migración e infiltración de leucocitos como los procesos con mayor aumento en las CMSP de los pacientes con SCACEST (Figura R7, Tabla A6). De los 41 genes relacionados con la migración de células mieloides y del conjunto de leucocitos, 21 tienen un sentido en su expresión consistente con un aumento en la migración (z-score 2,054 y 1,709 respectivamente; Tabla A6). Asimismo, identificamos genes cuya sobre-expresión (IL10, ADORA3) y disminución (FCER1A, MS4A2) harían que aumentase la apoptosis de leucocitos (Tabla A6).

Por el contrario, según el análisis IPA, en las CMSP de los pacientes de SCACEST habría una disminución en la respuesta de linfocitos T, macrófagos y neutrófilos, comparado con los pacientes con AI (Figura R7, Tabla A7). La sobre-expresión de genes que codifican para la proteína

**Tabla R7. Vías de señalización relacionadas con el sistema inmune que están afectadas en las CMSP de los pacientes de SCACEST.**

Vías de Señalización de Ingenuity	-log (p-valor)	Ratio	Genes
Señalización y Producción de IL12 en Macrófagos	3,12E00	5,16E-02	PPARG, APOC1, JUN, IL10, MAF, AKT3, APOC2, IL4
Señalización de PI3K en Linfocitos B	2,43E00	4,76E-02	VAV2, PLCD3, JUN, ATF3, CAMK2A, AKT3, IL4
Citoquinas implicadas en mediar la Comunicación entre Células del Sistema Inmune	2,07E00	7,27E-02	IL8, IL10, IL32, IL4
Señalización de HMGB1	1,91E00	5,00E-02	IL8, JUN, RHOD, AKT3, SERPINE1
Producción de Óxido Nítrico y Especies Reactivas de Oxígeno	1,8E00	3,33E-02	APOC1, JUN, PPP1R14D, RHOD, AKT3, APOC2, IL4
Señalización de IL8	1,38E00	3,11E-02	VEGFA, IL8, RHOD, AKT3, MMP2, LIMK2
Interacción de Células Dendríticas y Células NK	1,37E00	4,17E-02	CAMK2A, ACTB, NCR3, IL4
Señalización de TREM-1	1,36E00	4,55E-02	IL8, IL10, AKT3
Señalización de IL6	1,31E00	4,00E-02	IL1R2, IL8, JUN, TNFAIP6

El ratio se calcula con el número de genes diferencialmente expresados que participan en la vía de señalización, dividido por el número total de genes en esa vía, según la base de datos del programa IPA. La significación estadística se calculó utilizando el test exacto de Fisher y se representa como  $-\log(p\text{-valor})$ .



**Figura R7. Funciones relacionadas con el Sistema Inmune.** Representación de las funciones relacionadas con el sistema inmune significativamente asociadas al conjunto de genes expresados diferencialmente en CMSP de los pacientes de SCACEST, calculado con el programa IPA. El eje X muestra el z-score para cada grupo ontológico, que predice una regulación positiva (rojo) o negativa (verde) para los genes asociados a esa función.

anti-inflamatoria IL10 o para PPAR $\gamma$ , que se ha asociado a la polarización a M2 de los M $\phi$ ,<sup>35</sup> unido a la expresión disminuida de genes pro-inflamatorios (IL32, LAG3, CXCL9, IL34) harían que se regulase negativamente la respuesta de estas células del sistema inmune (Tabla A7).

En conjunto, al analizar las diferencias de expresión génica entre pacientes de AI y pacientes con IAM (SCACEST), comprobamos que a nivel transcripcional hay muchos genes que están implicados en la regulación negativa de la respuesta inmune. Esto apunta a que, además de la inflamación sistémica que afecta a las CMSP después del IAM, en estos pacientes están produciéndose al mismo tiempo mecanismos compensatorios para atenuar un exceso de inflamación, un hecho que, por otra parte, puede afectar su respuesta frente a futuras colonizaciones por patógenos.

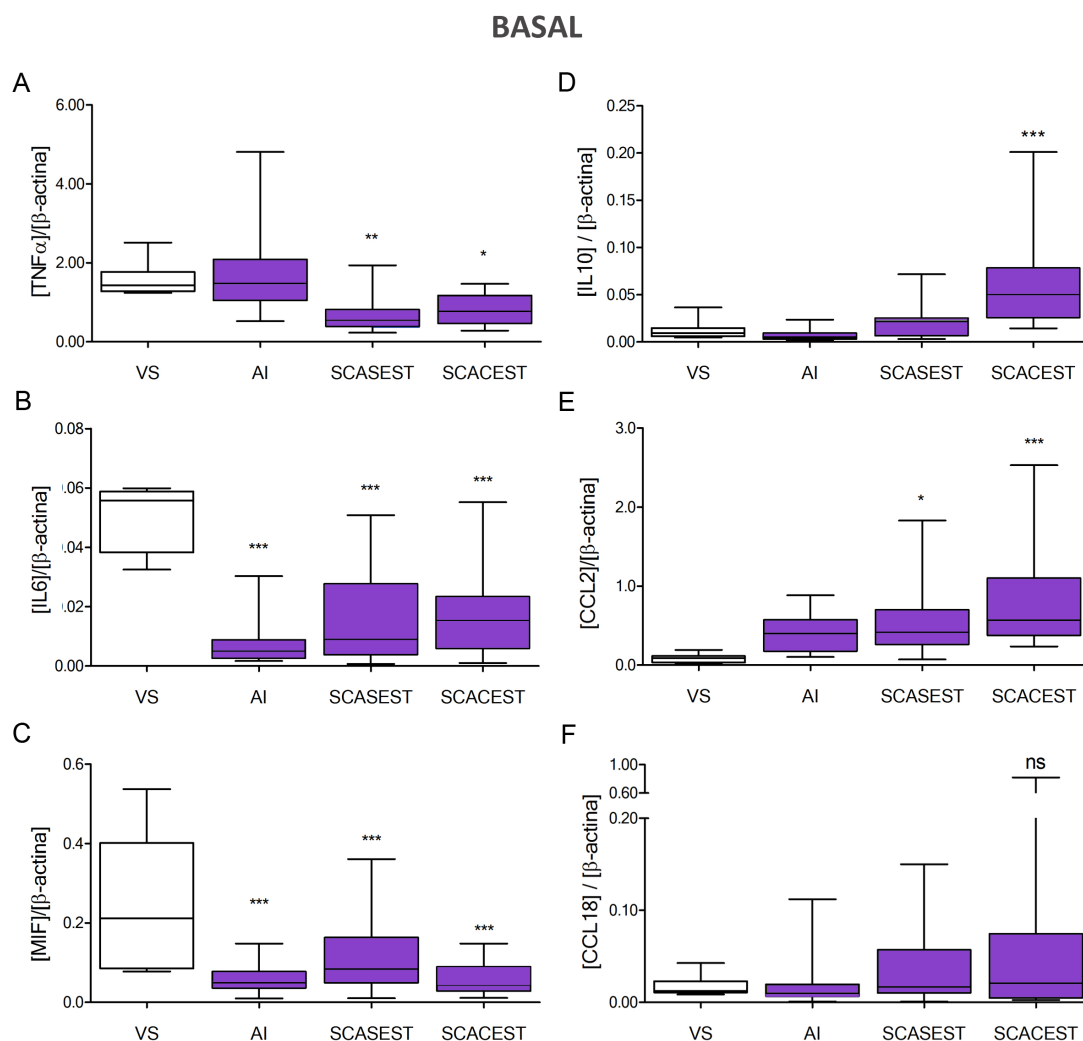
#### **4.5. El perfil anti-inflamatorio de los Monocitos de sangre periférica correlaciona con la severidad de los pacientes con SCA.**

El análisis funcional del array de expresión nos reveló la existencia de una posible regulación hacia una respuesta anti-inflamatoria del sistema inmune como consecuencia del IAM. Además, estos resultados concuerdan con estudios previos de nuestro laboratorio en los que se observaba un aumento significativo del regulador negativo IRAK-M en M $\phi$  de sangre periférica pocas horas después del IAM,<sup>69</sup> lo que apuntaba a un cambio hacia una respuesta anti-inflamatoria en estas células. Por ello, decidimos centrar nuestra investigación en este aspecto y estudiar si la inflamación inicial provocada por el IAM da lugar a una posterior polarización del sistema inmune. En particular, centramos el estudio en los M $\phi$  de sangre periférica, ya que estas células juegan un papel principal en la respuesta inmune innata, así como en el desarrollo y progresión de los SCA. Como en el caso de las CMSP, para el estudio se recogieron muestras de sangre 24-36h después del episodio cardiovascular. Decidimos incluir todos los grupos de pacientes de IAM (SCASEST y SCACEST), así como los pacientes de AI y un grupo de 10 voluntarios sanos (VS), para identificar si existían diferencias en la activación de los M $\phi$  debido a los distintos contextos clínicos. A pesar de que los pacientes de SCASEST no se incluyeron en los análisis de expresión génica debido a la gran variabilidad y al poco número de pacientes incluidos en el array (n=5), para los estudios del perfil inflamatorio de los M $\phi$  se incluyeron estos pacientes con una muestra mayor (n=24) que compensara la gran variabilidad existente dentro de los pacientes.

En primer lugar analizamos el perfil inflamatorio de los M $\phi$  cuantificando por qPCR los niveles de expresión de distintos genes característicos del fenotipo pro-inflamatorio clásico o M1 y de la respuesta alternativa o M2 (Figura R8). Se valoró la expresión de los genes pro-



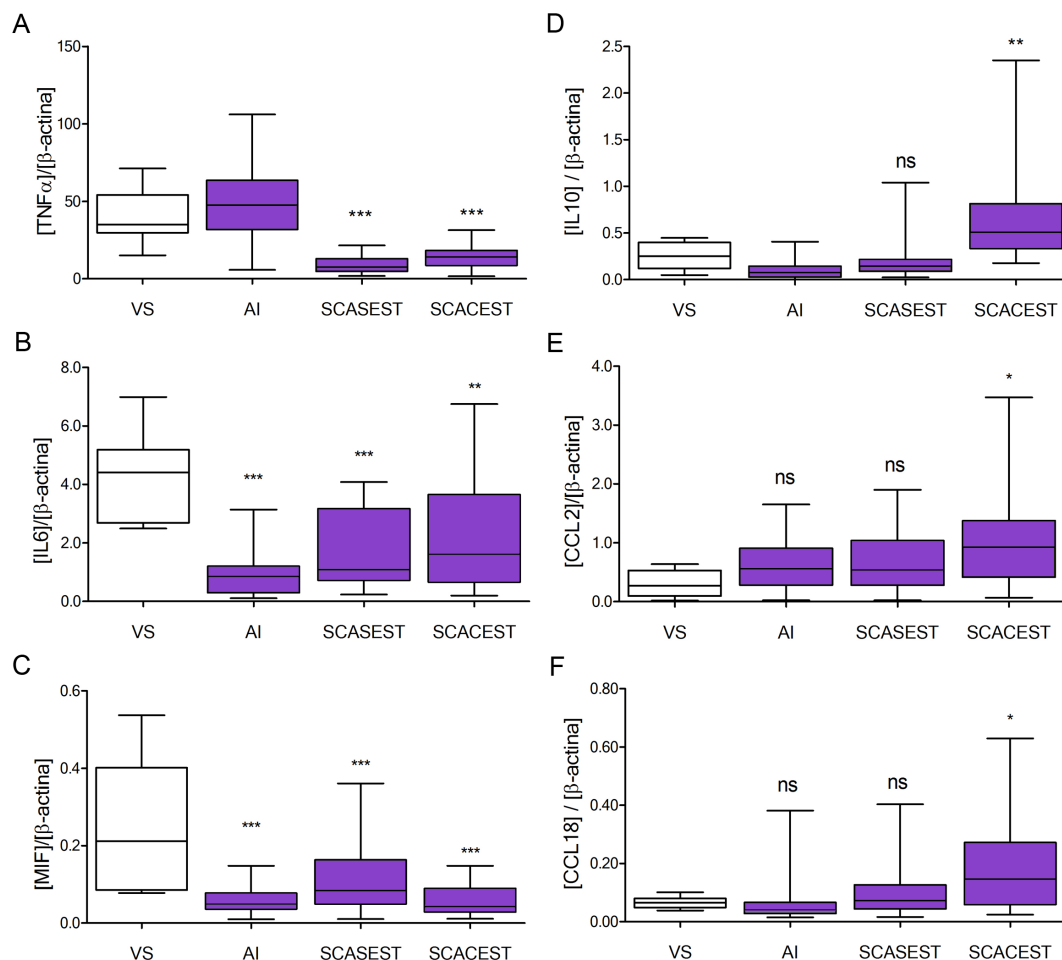
inflamatorios  $\text{TNF}\alpha$ , IL6 y Migration Inhibitory Factor (MIF) (Figura R8 A-C), de los genes anti-inflamatorios IL10, CCL18,<sup>192</sup> así como de la quimioquina MCP-1/CCL2, asociada al reclutamiento de  $\text{Th2}$ <sup>250</sup> (Figura R8 D-F). Los resultados obtenidos indican que en aquellos pacientes con mayor número de lesiones y más estenosis coronaria (SCASEST y SCACEST), los M $\phi$  de sangre periférica tienen menores niveles de expresión de las citoquinas pro-inflatorias (Figura R8 A-C). Por el contrario, los niveles de expresión de los factores de respuesta alternativa o M2, IL10 y CCL2, eran mayores en los pacientes con SCACEST comparado con los pacientes con AI y con los VS (Figura R8 D, E). No encontramos diferencias significativas para la quimioquina CCL18 (Figura R8 F). Estos datos sugieren que los M $\phi$  de los pacientes con SCACEST presentan un fenotipo M2.



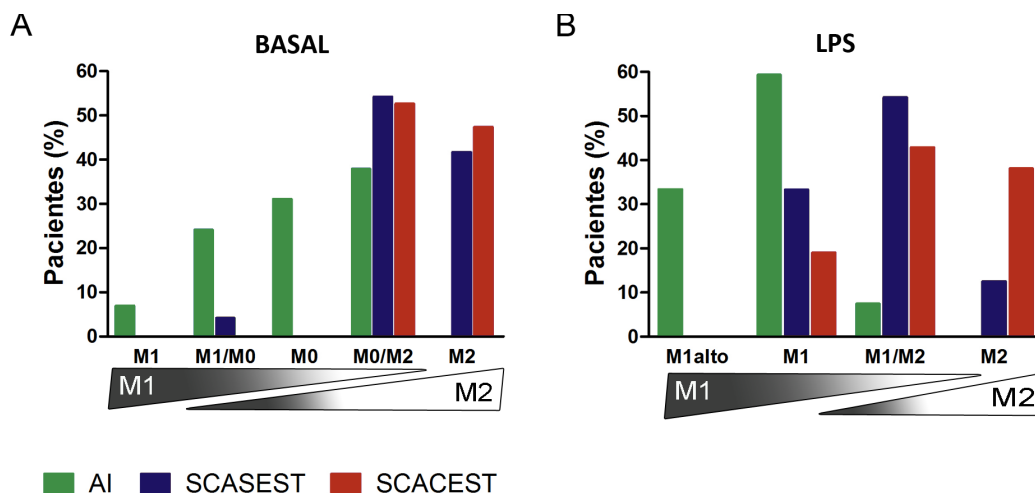
**Figura R8. La polarización M2 de los M $\phi$  de sangre periférica correlaciona con la gravedad de la enfermedad. A-D,** Análisis por qPCR de los niveles de ARNm a nivel basal de  $\text{TNF}\alpha$  (A), IL6 (B), MIF (C), IL10 (D), CCL2 (E) y CCL18 (F) en monocitos de sangre periférica de los pacientes de SCA (morado) y los VS (blanco). Se muestra el ratio del ARNm [gen]/[ $\beta$ -actina]. Los gráficos son box plots de la  $M \pm \text{DE}$ . VS n=10, pacientes de SCA: AI n=29, SCASEST n= 24, SCACEST n= 21. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0.001$  pacientes vs VS (ANOVA/Dunn).

A continuación, analizamos la respuesta inflamatoria de los M $\phi$  de los pacientes y los VS en respuesta al LPS (3h, 10ng/ml; Figura R9). Al analizar la expresión de los factores pro y anti-inflamatorios en los M $\phi$  estimulados con LPS, constatamos que las células provenientes de los pacientes con IAM (SCASEST y SCACEST) no fueron capaces de aumentar la expresión de TNF $\alpha$ , IL6 o MIF como ocurría en los VS (Figura R9 A-C). Sin embargo, sólo los M $\phi$  de los pacientes con SCACEST presentaban un incremento significativo de los niveles de IL10, CCL2 y CCL18 (Figura R9 D-F). Estos resultados indican que los M $\phi$  de los pacientes con IAM desarrollan una clara respuesta anti-inflamatoria y se corresponden con los resultados obtenidos a nivel de expresión basal, que apuntaban a una activación M2 (Figura R8). No obstante, en el caso específico de los pacientes de SCACEST, están más claramente polarizados hacia un fenotipo M2

## LPS



**Figura R9. Los M $\phi$  de sangre periférica de los pacientes de SCACEST presentan tolerancia a endotoxinas. A-D,** Análisis por qPCR de los niveles de ARNm tras la estimulación con LPS (3h, 10ng/ml) de TNF $\alpha$  (A), IL6 (B), MIF (C), IL10 (D), CCL2 (E) y CCL18 (F) en monocitos de sangre periférica de los pacientes de SCA (morado) y los VS (blanco). Se muestra el ratio del ARNm [gen]/[β-actina]. Los gráficos son box plots de la M $\pm$ DE. VS n=10, pacientes de SCA: AI n=29, SCASEST n= 24, SCACEST n= 21. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 pacientes vs VS (ANOVA/Dunn).



**Figura R10. Clasificación del perfil inflamatorio de los Mφ de sangre periférica de los pacientes de SCA. A-B,** Índice M1/M2 de los pacientes de AI (barras verdes), SCASEST (barras azules) y SCACEST (barras rojas) calculado en base a los niveles de ARNm de TNFα e IL10 en los Mφ de sangre periférica a nivel basal (A) y después de 3h de estímulo con LPS (10ng/ml, B). Los datos representados son el porcentaje de pacientes dentro de cada grupo del Índice.

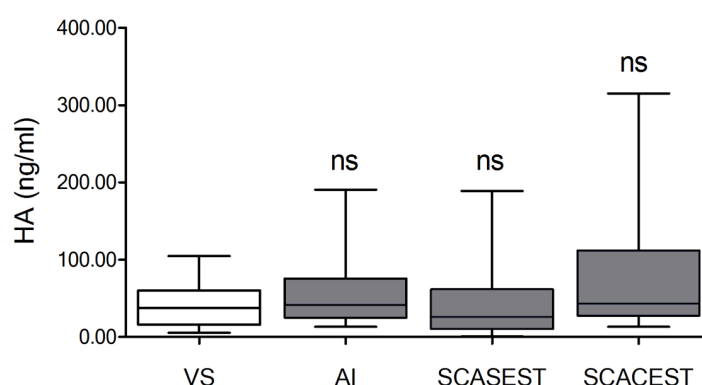
y, en consecuencia, su tolerancia a endotoxinas es más pronunciada. Los pacientes con SCACEST son los que muestran mayor daño en los tejidos (mayor número de lesiones coronarias y más necrosis miocárdica), con lo que parece existir una relación entre el daño en los tejidos y la polarización hacia una respuesta alternativa o M2.

Dado que dentro de cada grupo de SCA existe heterogeneidad en la respuesta inflamatoria y con el objetivo de establecer una clasificación más ajustada del perfil inflamatorio de los Mφ de sangre periférica de estos pacientes, establecimos un índice M1/M2 (Materiales y Métodos 3.17). Este índice se calculó en base a los niveles de TNFα e IL10 en los Mφ de sangre periférica de los pacientes, tanto a nivel basal (Figura R8 A y D), como después de la exposición a LPS (Figura R9 A y D). A nivel basal, los Mφ de todos los pacientes con SCASEST, y casi la totalidad de los pacientes con SCACEST (96%), se distribuyen a lo largo del rango M2 (Figura R10 A). Por el contrario, los pacientes con AI se clasifican como M1 (31%), M0 (31%) y M0/M2 (38%). Una vez estimulados con LPS (10ng/ml, 3h, Figura R10 B), pocos pacientes con SCACEST y SCASEST presentan una activación clásica M1 de los Mφ (33% y 19% respectivamente). Por el contrario, la mayoría presentan una activación alternativa M2 (67% y 81% respectivamente), indicativo de un estado refractario o de tolerancia a endotoxina. Sin embargo, gran parte de los pacientes con AI muestran una respuesta M1 (59%), e incluso un 33% presenta una activación M1 más pronunciada que un control sano. Es importante señalar que el perfil inflamatorio de los Mφ de los pacientes fue analizado pasadas las primeras 24h (30±6h) del episodio coronario, para evitar la primera fase pro-inflamatoria.

#### 4.6. El nivel de ADN mitocondrial en suero es mayor en aquellos pacientes con mayor daño tisular.

Una vez establecido que los M $\phi$  de sangre periférica de los pacientes con IAM mostraban una clara tolerancia a endotoxinas, más acusada en los pacientes con SCACEST, quisimos estudiar la causa de este fenómeno. Una de las características diferenciales de los pacientes de SCACEST es que tienen más daño tisular causado por un mayor número de lesiones coronarias y más necrosis después del IAM. Teniendo en cuenta que en estos pacientes es precisamente en los que la tolerancia a endotoxinas es más acusada, y basándonos en estudios previos de otros grupos y de nuestro laboratorio, decidimos analizar la presencia en el suero de estos pacientes de determinadas moléculas liberadas por los tejidos dañados que pueden actuar como DAMPs endógenos, así como correlacionar su concentración con el grado de tolerancia a endotoxinas que manifestaban sus M $\phi$ .

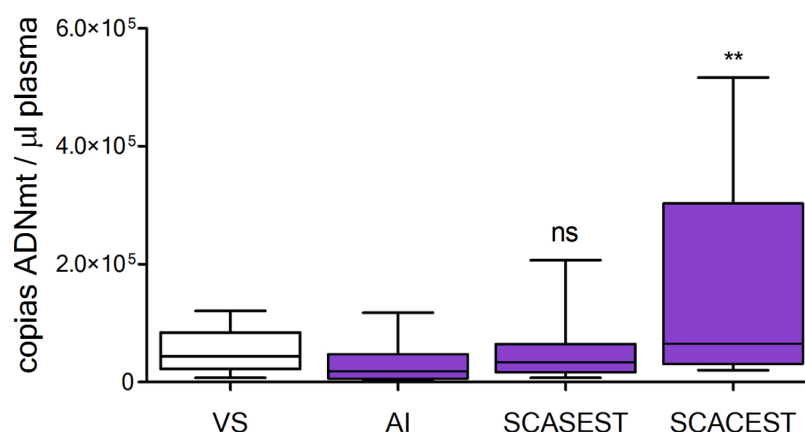
En numeroso estudios previos se ha demostrado que el daño tisular provoca la liberación de diversos componentes de la matriz extracelular como el ácido hialurónico (HA),<sup>2</sup> pudiendo ser reconocidos por el sistema inmune innato como un DAMP. El HA es degradado en pequeños fragmentos de bajo peso molecular que activan procesos inflamatorios y subsiguientes estados de tolerancia en distintos tipos celulares, incluyendo los M $\phi$ .<sup>68, 219, 273</sup> Por ello, quisimos comprobar si en los pacientes de SCA, en los cuales existe daño tisular, se liberaba HA a la circulación, pudiendo ser la causa de la polarización de los M $\phi$  al fenotipo M2 que se observa en estos pacientes. Sin embargo, al analizar la concentración de HA en el suero de los pacientes con SCA y en los VS, no encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos (Figura R11).



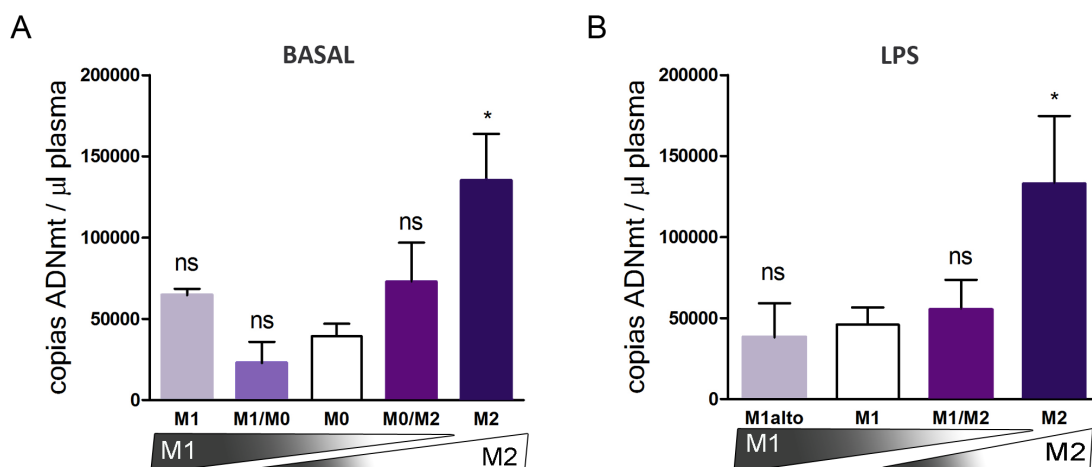
**Figura R11. La concentración de HA en el plasma de los pacientes con SCA es similar a la de VS.** Cuantificación de la concentración de HA por ELISA en el plasma de pacientes de SCA (gris) y VS (blanco). Los gráficos son box plots de la M $\pm$ DE. VS n=10, pacientes de SCA: AI n=29, SCASEST n= 24, SCACEST n= 21. ns: no significativo, pacientes vs VS (ANOVA/Dunn).

Por otra parte, en estudios recientes se ha demostrado la existencia de ADN mitocondrial (ADNmt) en el suero de pacientes con trauma agudo,<sup>339</sup> así como en el fluido de las articulaciones en pacientes con artritis reumatoide.<sup>51</sup> Estos trabajos indican que el ADNmt podría contribuir a la respuesta inflamatoria al actuar como un DAMP.<sup>56</sup> Así mismo, se ha descrito que existe un aumento de los niveles de ADNmt en infarto cerebral agudo<sup>307</sup> y en otras enfermedades.<sup>182</sup> De esta forma, el daño tisular asociado al SCA podría estar liberando ADNmt a la circulación. Con estos antecedentes, decidimos examinar si la polarización a M2 que observamos en los Mφ de sangre periférica en los pacientes con SCA más severo se correlacionaba con mayores niveles de ADNmt en sangre. Para ello, medimos el ADNmt presente en el suero de los pacientes reclutados, así como en los VS. Tal y como se aprecia en la Figura R12, el nivel de ADNmt en el suero era significativamente mayor (~3,5 veces más) en los pacientes del grupo SCACEST comparado con los pacientes de AI y los VS, mientras que en los pacientes de SCASEST este aumento no llega a ser significativo.

Para comprobar si existía una correlación entre los niveles de ADNmt y el perfil inflamatorio del Mφ, comparamos los niveles de ADNmt respecto al índice M1/M2 que presentan los Mφ de los pacientes. En este caso, comprobamos que la concentración de ADNmt era significativamente mayor en los pacientes que presentaban Mφ con un fenotipo M2, tanto en relación al índice a nivel de expresión basal (Figura R13 A), como en relación al índice M1/M2 tras la exposición al LPS (Figura R13 B).



**Figura R12. El nivel de ADNmt presente en el suero es mayor en los pacientes de SCACEST.** Niveles de ADNmt en el plasma de los pacientes de SCA (morado) y los VS (blanco). Los gráficos son box plots de la M±DE. VS n=10, pacientes de SCA: AI n=29, SCASEST n= 24, SCACEST n= 21. \*\*p<0,01, ns: no significativo, pacientes vs VS (ANOVA/Dunn).



**Figura R13. Los niveles de ADNmt en suero correlacionan con el perfil anti-inflamatorio de los M $\phi$  de sangre periférica de los pacientes.** Niveles circulantes de ADNmt en el suero de los pacientes de SCA relacionado con el índice M1/M2 de los M $\phi$  de sangre periférica. **A**, Índice a nivel basal, grupos: M1 n=2, M1/M0 n=5, M0 n=19, M2/M0 n=28, M2 n=21. M $\pm$ DE; \*p<0,05, ns: no significativo; grupos vs M0 (ANOVA/Dunn). **B**, Índice después del estímulo con LPS (3h, 10ng/ml), grupos: M1 alto n=5, M1 n=27, M2/M1 n=23, M2 n=20. M $\pm$ DE; \*p<0,05, ns: no significativo; grupos vs M1 (ANOVA/Dunn).

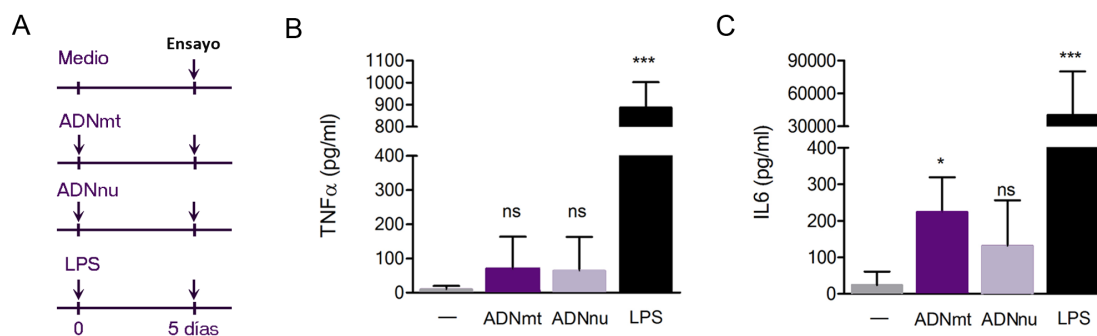
Estos datos confirman que hay un aumento significativo de ADNmt circulante en aquellos pacientes que tienen mayor daño en los tejidos (grupo SCACEST), hecho que correlaciona estadísticamente con el fenotipo M2 que presentan sus M $\phi$ .

## 4.7. La exposición prolongada de los M $\phi$ al ADN mitocondrial induce una respuesta M2.

Los resultados obtenidos en los pacientes de SCA muestran que existe un aumento en los niveles de ADNmt en circulación en aquellos pacientes que presentan M $\phi$  con un fenotipo M2. Recientemente, se ha descrito que el ADNmt puede provocar una respuesta inflamatoria en los neutrófilos<sup>339</sup> y que la inyección intra-articular de ADNmt en ratones induce artritis mediada por M $\phi$ .<sup>51</sup> En otros contextos, como por ejemplo las infecciones por bacterias Gram negativas o su simulación mediante la estimulación con LPS, se ha demostrado que una activación inflamatoria inicial acaba evolucionando hacia una respuesta anti-inflamatoria o M2.<sup>29, 246</sup> Por ello, decidimos estudiar si la exposición a ADNmt también induce el desarrollo de un fenotipo M2 provocando un estado de tolerancia a endotoxinas en los M $\phi$ . Con este propósito, incubamos M $\phi$  humanos

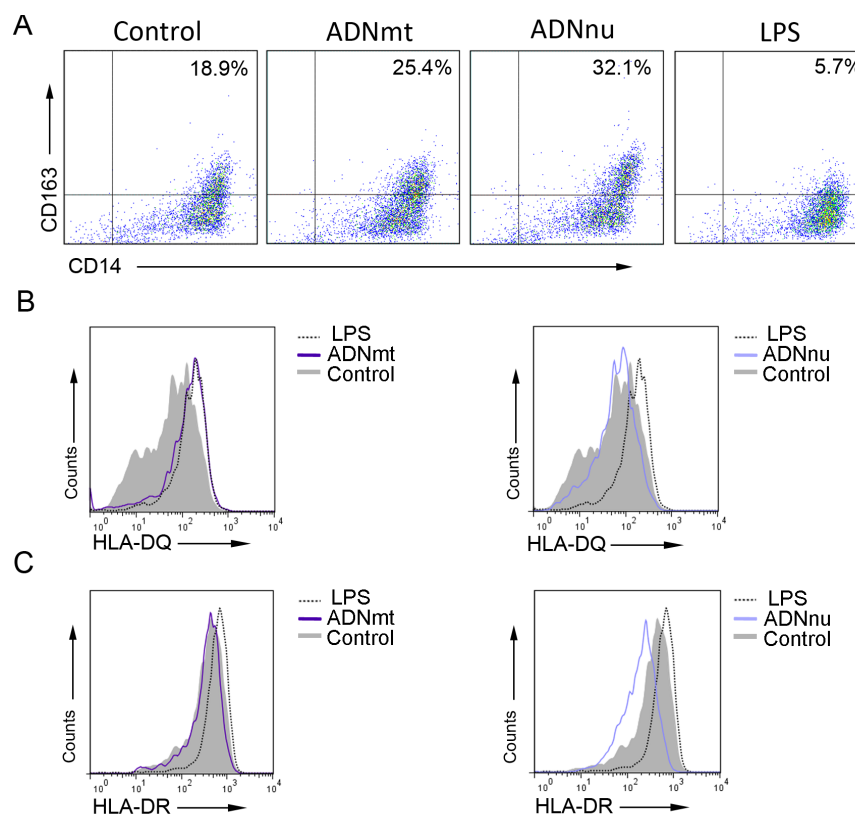
procedentes de sangre periférica de voluntarios sanos durante 5 días con 5µg/ml de ADNmt aislado de la línea celular humana HeLa (Figura R14 A). Este modelo pretende simular lo que hemos comprobado que sucede en los pacientes con IAM, en los cuales, después del episodio de infarto las células circulantes están en contacto durante periodos largos de tiempo con el ADNmt.

Pasado el tiempo de incubación se determinó la producción de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos. Comprobamos que el ADNmt induce una leve respuesta inflamatoria, con un aumento de secreción de la citoquina pro-inflamatoria IL6, pero que en TNFα no llega a ser significativo (Figura R14 B, C). No se hallaron niveles detectables de las citoquinas IL1β e IL12p40 (datos no mostrados). En estos ensayos se incluyó el tratamiento con ADN nuclear (ADNnu) como control de la contaminación residual en los extractos de ADNmt (ver materiales y métodos apartado 3.6). Al contrario que con el ADNmt, el tratamiento con el ADNnu no afectaba a la producción de citoquinas, que eran similares a la de las células sin tratamiento (Figura R14 B, C). El análisis de la producción de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos a 24h arrojó los mismos resultados que a 5 días (datos no mostrados).



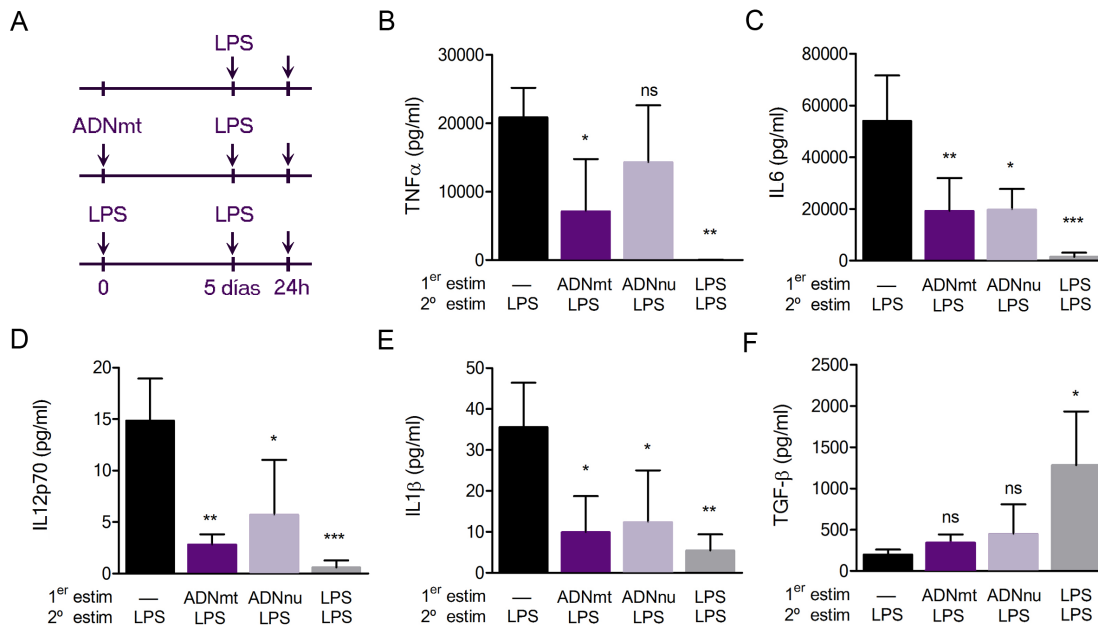
**Figura R14. Respuesta de los Mφ humanos de sangre periférica al ADN mitocondrial.** A, Modelo experimental: Mφ de sangre periférica de VS se estimularon con ADNmt (5µg/ml, barra morada clara), ADNnu (5µg/ml, barra morada oscura), LPS (10ng/ml, barra negra) o sin estimular (barra gris) durante 5 días. B-C, Niveles de proteína en el sobrenadante de los cultivos determinados por CBA. B, TNFα; C, IL6. M±DE, n=3. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001, ns: no significativo, tratamientos vs control (ANOVA/Dunn).

Con el objetivo de caracterizar mejor el perfil de los M $\phi$  pre-tratados con el ADNmt, analizamos la expresión del receptor depurador o *scavenger* CD163, un antígeno específico de macrófagos M2. Se ha demostrado que CD163 se induce en una subpoblación de M $\phi$  polarizados en respuesta a factores anti-inflamatorios como la IL4, la IL10 o los corticosteroides.<sup>38, 293</sup> La exposición prolongada al ADNmt o al ADNnu induce en los M $\phi$  un leve aumento de la frecuencia de CD163, pero no llega a ser significativa comparado con el control (Figura R15 A). Del mismo modo, la expresión en superficie de las moléculas presentadoras de antígeno MHC de clase II, HLA-DQ y HLA-DR, tenían un patrón de expresión similar al inducido por la estimulación con LPS (Figura R15 B, C), sin llegar a ser significativo respecto al control.



**Figura R15. La exposición al ADNmt no altera la expresión en superficie de CD163, HLA-DQ y HLA-DR.** **A**, Gráficos Dot Blot de la frecuencia de CD163+CD14+ en M $\phi$  pre-expuestos 5 días a ADNmt (segundo panel), ADNnu (tercer panel), LPS (último panel) o sin tratamiento (primer panel). Los valores del cuadrante superior derecho representan la media de 3 experimentos. **B-C**, Histogramas de la expresión en superficie de HLA-DQ (**B**) y HLA-DR (**C**) en M $\phi$  CD14+, pre-expuestos a ADNmt (izquierda, línea morada), ADNnu (derecha, línea morada) o LPS (línea discontinua), comparado con M $\phi$  sin tratamiento (relleno gris). Figuras representativas de 3 experimentos independientes.





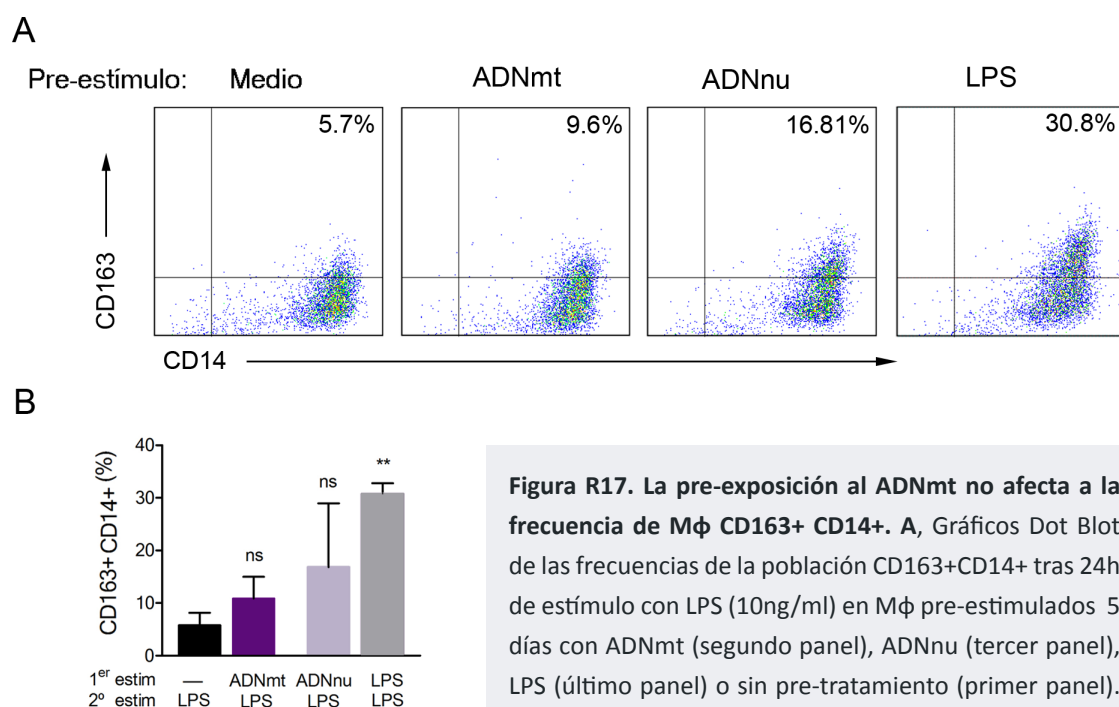
**Figura R16. La exposición al ADNmt reprograma a los Mφ hacia una respuesta anti-inflamatoria al LPS.** **A**, Modelo experimental: Mφ de sangre periférica de VS se estimularon con ADNmt (5μg/ml, barra morado claro), ADNnu (5μg/ml, barra morado oscuro), LPS (10ng/ml, barra gris) o sin estimular (barra negra). Pasados 5 días se lavaron y se estimularon con LPS (10ng/ml) durante 24h. **B-F**, niveles de las proteínas TNFα (**B**), IL6 (**C**), IL12p70 (**D**), IL1β (**E**) y TGF-β (**F**) en el sobrenadante de los cultivos determinado por CBA. M±DE, n=4. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ns: no significativo, vs el control correspondiente sin pre-estímulo (ANOVA/Dunn).

Para comprobar si esta leve respuesta inflamatoria podría inducir una respuesta de los Mφ tipo M2 o de tolerancia a endotoxinas a un estímulo inflamatorio posterior, transcurridos los 5 días de pre-incubación con el ADNmt o el ADNnu, los Mφ se estimularon con LPS (24h, 10ng/ml; Figura R16 A). Mientras que las células que no habían sido pre-tratadas eran capaces de producir altos niveles de las citoquinas pro-inflamatorias TNFα, IL6, IL1β e IL12p70 en respuesta a la estimulación con LPS, la pre-incubación con el ADNmt provocó una reducción significativa en la producción de estas citoquinas pro-inflamatorias (Figura R16 B-E). En el caso del pre-tratamiento con el ADNnu, se afectaba la producción de las citoquinas IL6, IL12p70 e IL1β (Figura R16 C, D y E). Sin embargo, en este caso los cambios en TNFα no fueron significativos (Figura R16 B). Esta reducción en la producción de citoquinas pro-inflamatorias también se produjo en los Mφ pre-estimulados con LPS que se utilizaron como control positivo del fenotipo tolerante o M2.<sup>71, 250</sup> Asimismo, la pre-incubación con LPS propicia un aumento de la producción de TGF-β, proteína característica de la respuesta M2, pero no así la pre-incubación con el ADNmt o el ADNnu (Figura R16 F). En conjunto, estos resultados demuestran que, aunque el ADNmt induce una inflamación con producción significativa de IL6 (Figura R15), contribuye también a la activación de procesos

que conducen a la reprogramación a una respuesta alternativa M2 (Figura R16). Por otro lado, la pre-incubación con ADNnu, que no induce una respuesta inflamatoria significativa, genera una tolerancia a endotoxinas mas atenuada que el ADNmt.

En el análisis por citometría de flujo de CD163, marcador de activación M2, comprobamos que cuando se pre-trataba con ADNmt o ADNnu, el estímulo con LPS producía un leve aumento en la frecuencia de los Mφ CD163+CD14+ comparado con los Mφ sin pre-tratamiento, pero que no llega a ser estadísticamente significativo (Figura R17). Este aumento de la población CD163+CD14+ era significativo en el caso de pre-exposición al LPS que utilizamos como control positivo del fenotipo M2 (Figura R17 B).

La disminución de la presentación antigénica en los Mφ humanos tolerantes a endotoxina es una característica que ha sido descrita tanto en nuestro laboratorio como por otros autores.<sup>71, 325</sup> Por ello, evaluamos las moléculas presentadoras de antígeno MHC de clase II HLA-DQ y HLA-DR por citometría de flujo (Figura R18). Tras 24 horas de estímulo con LPS, tanto los niveles de HLA-DQ como de HLA-DR eran significativamente menores en aquellos Mφ pre-tratados con el ADNmt, con una disminución de la expresión de aproximadamente la mitad para HLA-DQ y de

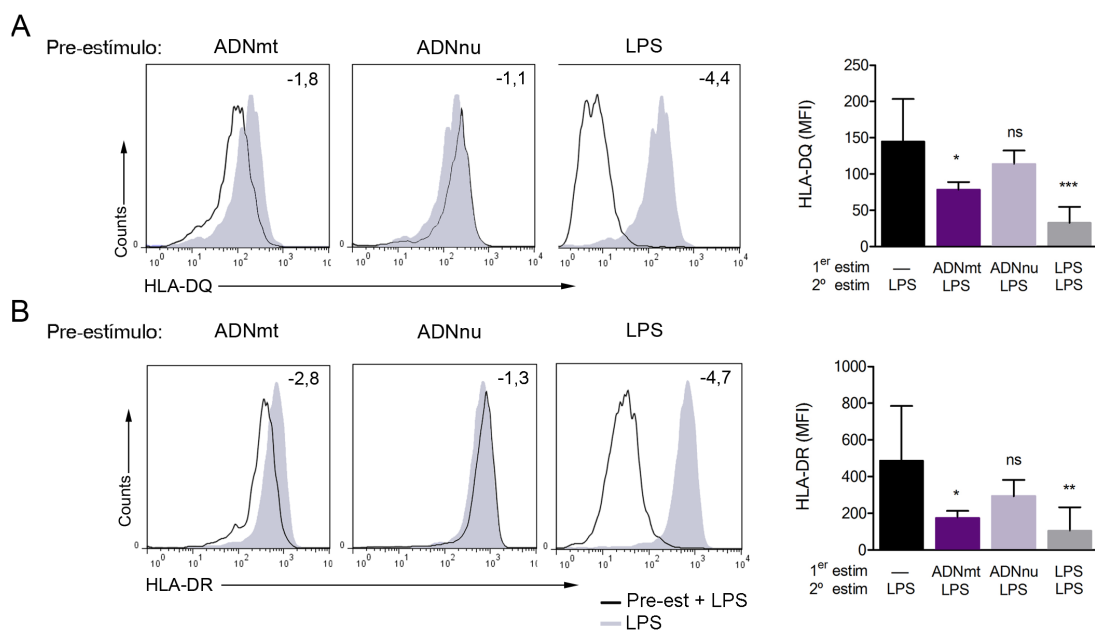


**Figura R17. La pre-exposición al ADNmt no afecta a la frecuencia de Mφ CD163+ CD14+.** **A**, Gráficos Dot Blot de las frecuencias de la población CD163+CD14+ tras 24h de estímulo con LPS (10ng/ml) en Mφ pre-estimulados 5 días con ADNmt (segundo panel), ADNnu (tercer panel), LPS (último panel) o sin pre-tratamiento (primer panel). Figura representativa de 3 experimentos independientes. Los valores del cuadrante superior derecho representan la media de los 3 experimentos. **B**, Representación del análisis estadístico de las frecuencias de CD163+CD14+ M±DE, n=3. \*\*p<0,01, ns: no significativo, vs el control correspondiente sin pre-tratamiento (ANOVA/Dunn).

un tercio para HLA-DR (Figura R18). Como era de esperar, en el modelo clásico de tolerancia a endotoxina en el que usamos el LPS como inductor de la tolerancia,<sup>71</sup> se produjo un marcado descenso en los niveles en superficie de HLA-DQ y HLA-DR después del segundo estímulo con LPS. Por el contrario, en Mφ pre-tratados con el ADNnu los niveles de HLA-DQ y HLA-DR eran comparables a los niveles de los Mφ sin pre-tratamiento (Figura R18).

Por tanto, aunque el ADNnu genera tolerancia a endotoxinas, la reprogramación de los Mφ es más atenuada comparado con el ADNmt, ya que los cambios en la secreción de citoquinas en los Mφ pre-tratados con ADNnu son menores (Figura R16) y no se producen cambios en la expresión en superficie de las moléculas presentadoras de antígeno (Figuras R18). Así, los extractos enriquecidos en ANDmt producen mayores efectos que los de ADNnu.

Los resultados obtenidos en estos experimentos indican que la tolerancia inducida por la exposición prolongada al ADNmt se asemeja a la tolerancia generada por el LPS. La tolerancia a endotoxinas inducida por el ADNmt se engloba dentro de los fenómenos de tolerancia cruzada o heterotolerancia, ya que según hemos observado el ADNmt (reconocido a través del TLR9<sup>339</sup>)



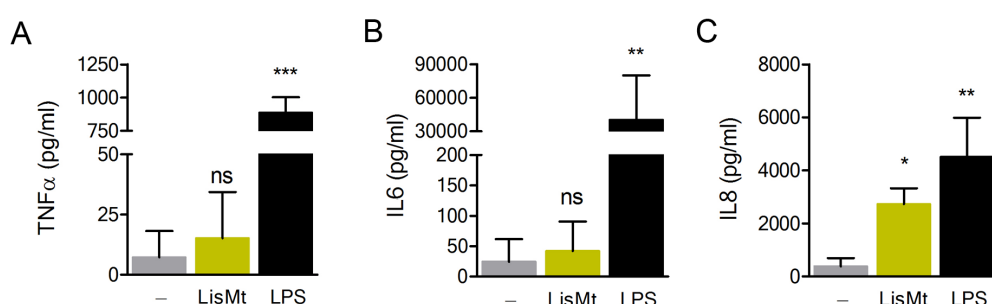
**Figura R18. La pre-exposición al ADNmt disminuye la expresión en superficie de HLA-DQ y HLA-DR en respuesta al LPS. A-B,** Histogramas de la expresión en superficie de HLA-DQ (**A**) y HLA-DR (**B**) en Mφ CD14+ tras 24h de estímulo con LPS (10ng/ml), determinado por citometría de flujo en Mφ pre-expuestos a ADNmt (línea negra, primer panel), ADNnu (línea negra, segundo panel), LPS (línea negra, tercer panel), comparado con Mφ sin pre-tratamiento (relleno gris, todos los paneles). Figura representativa de 4 experimentos independientes. El valor en la parte superior derecha representa el descenso en la media de la IMF de los 4 experimentos comparado con los controles sin pre-estímulo. **C-D,** Representación del análisis estadístico de la IMF de HLA-DQ (**C**) y HLA-DR (**D**). M±DE, n=4. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ns: no significativo, vs el control de Mφ sin pre-estímulo (ANOVA/Dunn).

provoca la tolerización al LPS, ligando del TLR4. En conjunto, los resultados obtenidos *in vitro* reflejan la situación observada en los pacientes de SCACEST, los cuales tenían elevados niveles de ADNmt circulante (Figura R12) y presentaban una marcada tolerancia a endotoxinas (Figura R9).

## 4.8. La exposición al conjunto de DAMPs mitocondriales induce una tolerancia a endotoxina más acusada.

El hecho de que se encontraran cantidades significativas de ADNmt circulante en los pacientes con SCA, indica que se ha producido una ruptura de la mitocondria como consecuencia de un daño y/o necrosis tisular. Se ha descrito que durante este proceso, además del ADNmt, son liberados a la circulación numerosos DAMPs mitocondriales, como por ejemplo los péptidos formilados<sup>339</sup> o el citocromo C.<sup>137</sup> Por otro lado, en un modelo de rata se ha demostrado que la inyección intravenosa de lisados mitocondriales causa inflamación pulmonar.<sup>339</sup>

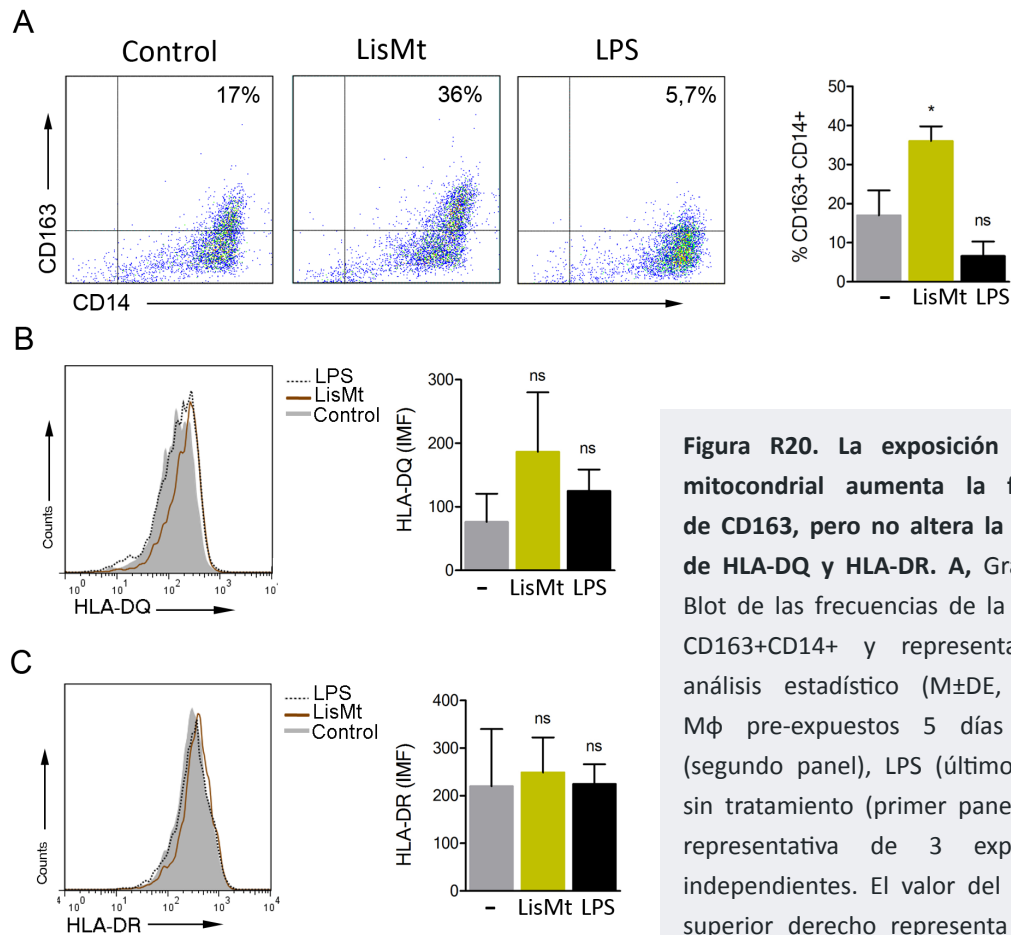
Por ello, decidimos comprobar si la estimulación con una combinación de los distintos DAMPs liberados por la ruptura de la mitocondria podría inducir una polarización hacia M2 mayor que hemos descrito previamente con la estimulación con ADNmt. Por otro lado, el uso de lisados mitocondriales (LisMt) completos reflejaría más fielmente la situación en los pacientes, ya que exponemos a los M $\phi$  al conjunto de DAMPs liberados por la ruptura mitocondrial. Comprobamos que la incubación con LisMt induce una respuesta inflamatoria leve (Figura R19). Se observa un ligero aumento en la producción de TNF $\alpha$  e IL6 a los 5 días de tratamiento con el LisMt, pero sin llegar a ser significativo (Figura R19 A, B). Sí se observa un aumento significativo en la producción de IL8 en los M $\phi$  expuestos al LisMt (Figura R19 C). Por otra parte, no se hallaron niveles detectables de las citoquinas IL1 $\beta$  e IL12p40 (datos no mostrados).



**Figura R19. La estimulación de M $\phi$  humanos de sangre periférica con lisado mitocondrial induce la producción de IL8.** M $\phi$  de sangre periférica de VS se estimularon con LisMt (20 $\mu$ g/ml, barra verde), LPS (10ng/ml, barra negra) o sin estimular (barra gris). **A-C**, niveles de las proteínas TNF $\alpha$  (**A**), IL6 (**B**) e IL8 (**C**) en el sobrenadante de los cultivos determinado mediante CBA. M $\pm$ DE, n=3. \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ns: no significativo, tratamientos vs control (ANOVA/Dunn).

La exposición al LisMt induce un aumento significativo de la frecuencia del receptor CD163 (Figura R20 A). La expresión de las moléculas de superficie HLA-DQ y HLA-DR en los Mφ CD14+ es similar a la inducida por el LPS, pero en ninguno de los casos los cambios son significativos frente al control sin estímulo (Figura R20 B, C). En conjunto, los resultados obtenidos con la exposición de los Mφ al LisMt son similares a los obtenidos para el ADNmt. Se induce una leve respuesta inflamatoria, pero en el caso del LisMt también aumenta la frecuencia del receptor CD163, lo que sugiere que los Mφ estarían polarizados hacia el fenotipo M2.

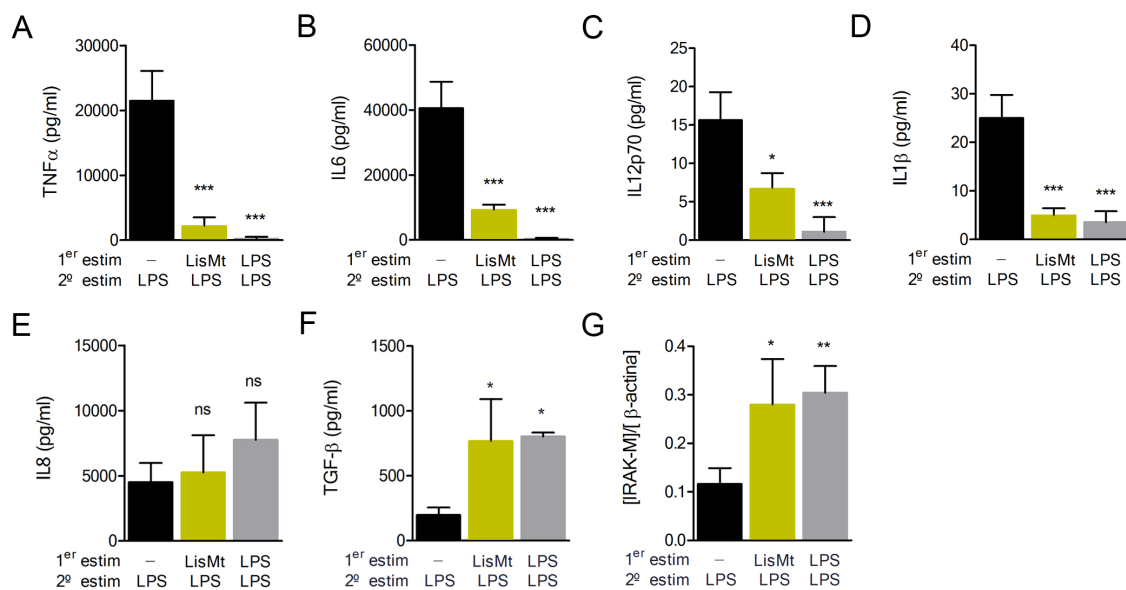
Este hecho se confirmó cuando se expusieron los Mφ pre-tratados con el LisMt a un estímulo inflamatorio. Para ello llevamos a cabo un modelo experimental como el descrito



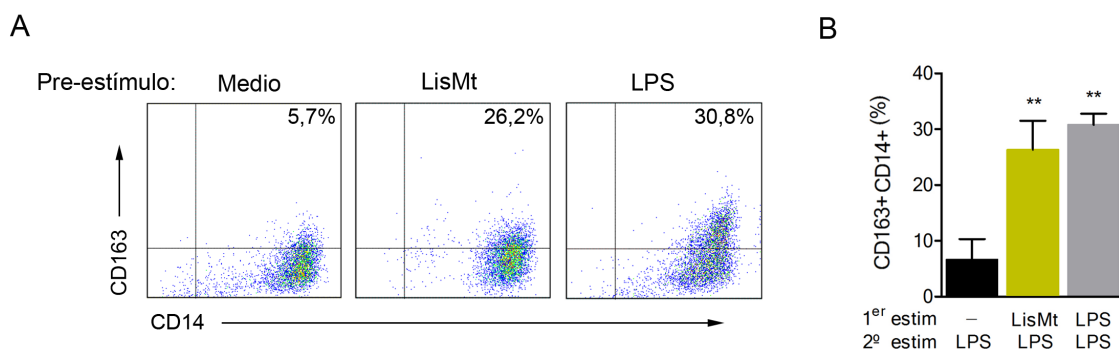
**Figura R20. La exposición al lisado mitocondrial aumenta la frecuencia de CD163, pero no altera la expresión de HLA-DQ y HLA-DR.** A, Gráficos Dot Blot de las frecuencias de la población CD163+CD14+ y representación del análisis estadístico ( $M \pm DE$ ,  $n=3$ ) en Mφ pre-expuestos 5 días a LisMt (segundo panel), LPS (último panel) o sin tratamiento (primer panel). Figura representativa de 3 experimentos independientes. El valor del cuadrante superior derecho representa la media de los 3 experimentos. \* $p < 0,05$ , ns: no significativo, tratamientos vs control (ANOVA/Dunn).

**B-C,** Histogramas de la expresión en superficie y representación del análisis estadístico de la IMF de HLA-DQ (**B**) y HLA-DR (**C**) en Mφ CD14+ pre-expuestos a LisMt (línea marrón), o LPS (línea discontinua), comparado con Mφ sin tratamiento (relleno gris). ns: no significativo, tratamientos vs control (ANOVA/Dunn). Figura representativa de 3 experimentos independientes.

anteriormente para el ADNmt (Figura R16 A), pero utilizando 20µg/ml de LisMt en lugar de ADNmt. En respuesta a la estimulación con LPS, la producción de IL8 no se ve afectada por la exposición previa al LisMt ni al LPS (Figura R21 E). Sin embargo, las células pre-expuestas al LisMt mostraban una disminución significativa en la producción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF $\alpha$ , IL6, IL12p70 e IL1 $\beta$  (Figura R21 A-D) comparado con las células no pre-tratadas, similar a la disminución observada con el pre-tratamiento con la endotoxina. En consonancia con esta respuesta anti-inflamatoria, la producción de TGF- $\beta$  aumentaba en los M $\phi$  pre-tratados con el LisMt (Figura R21 F). Más aun, los niveles de ARNm de IRAK-M, regulador negativo de la inflamación, también aumentan con el pre-tratamiento con LisMt (Figura R21 G). Tanto el TGF- $\beta$  como IRAK-M también están aumentados en los M $\phi$  pre-estimulados con LPS, control positivo del fenotipo M2.



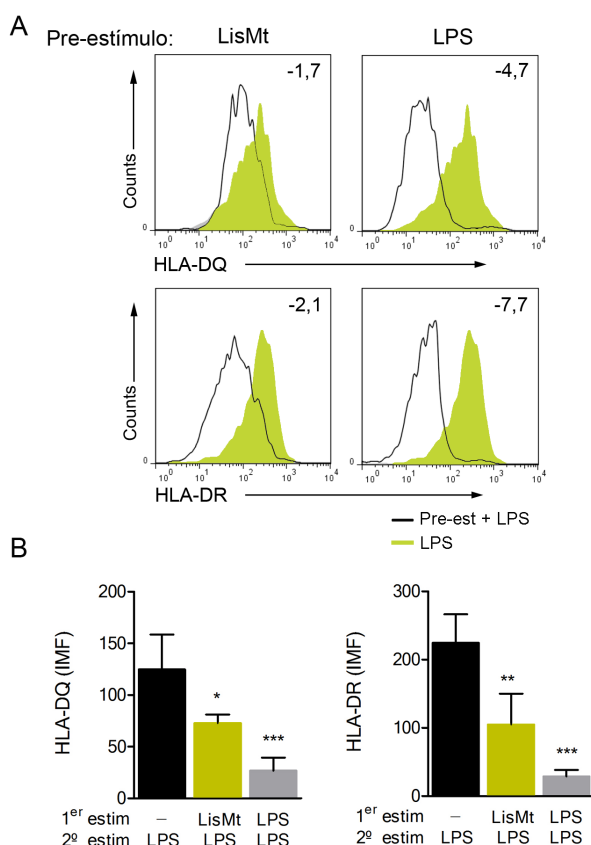
**Figura R21. Los lisados mitocondriales generan tolerancia a endotoxinas en M $\phi$ .** M $\phi$  humanos de sangre periférica de VS estimulados durante 5 días con LisMt (20µg/ml, barra verde), LPS (10ng/ml, barra gris) o sin estimular (barra negra). A los 5 días se estimularon con LPS (10ng/ml, 24h). **A-F**, niveles de las proteínas TNF $\alpha$  (**A**), IL6 (**B**), IL12p70 (**C**), IL1 $\beta$  (**D**), IL8 (**E**) y TGF- $\beta$  (**F**) en el sobrenadante de los cultivos determinado mediante CBA. M $\pm$ DE, n=3. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ns: no significativo, vs el control de M $\phi$  sin pre-estímulo (ANOVA/Dunn). **G**, Nivel de ARNm de IRAK-M. Se representa el ratio [gen]/[ $\beta$ -actina]. M $\pm$ DE. \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs el control de M $\phi$  sin pre-estímulo (ANOVA/Dunn).



**Figura R22. Aumento de la frecuencia de Mφ CD163+ CD14+ en respuesta al LPS por la pre-exposición a DAMPs mitocondriales.** **A**, Gráficos Dot Blot de las frecuencias de la población CD163+ CD14+ tras 24h de estímulo con LPS (10ng/ml) en Mφ pre-expuestos 5 días a LisMt (segundo panel), LPS (último panel) o sin pre-tratamiento (primer panel). Figura representativa de 3 experimentos independientes. Los valores en el cuadrante superior derecho representan la media de los 3 experimentos. **B**, Representación del análisis estadístico de las frecuencias de CD163+ CD14+. M±DE, n=3. \*\*p<0,01 vs el control de Mφ sin pre-estímulo (ANOVA/Dunn).

En este caso, a diferencia de lo descrito para el ADNmt o el ADNnu, la proporción de Mφ CD163+ CD14+ sí aumentó de forma significativa con la pre-incubación con LisMt (Figura R22). Asimismo, los niveles en superficie, tanto de HLA-DQ como HLA-DR, eran significativamente menores en las células pre-expuestas al LisMt comparado con las células sin pre-tratamiento, con una disminución de la IMF aproximadamente de la mitad (Figura R23). La disminución en superficie de HLA-DQ y HLA-DR en el modelo clásico de tolerancia a endotoxinas se muestra como control positivo del experimento (Figura R23).

Por tanto, cuando los Mφ se expusieron al conjunto de DAMPs mitocondriales, la polarización a M2 era más clara. Además, en respuesta a un estímulo inflamatorio, el descenso en la producción de citoquinas pro-inflamatorias y el aumento de marcadores M2 fue más pronunciado que cuando los Mφ se expusieron sólo al ADNmt. Esto probablemente es debido al efecto combinado de los distintos DAMPs mitocondriales al activar diferentes cascadas de señalización, lo que produce una tolerancia cruzada al TLR4 más acusada.



**Figura R23. Disminución de la expresión de moléculas presentadoras de antígeno tras el estímulo con LPS por la pre-exposición a lisado mitocondrial.** **A**, Histogramas de la expresión en superficie de HLA-DQ (arriba) y HLA-DR (abajo) tras 24h de estímulo con LPS (10ng/ml) en Mφ CD14+, determinado por citometría de flujo en Mφ pre-estimulados con LisMt (línea negra, primer panel) o LPS (línea negra, segundo panel), comparado con Mφ sin pre-estímulo (relleno verde, todos los paneles). Figura representativa de 4 experimentos independientes. Los valores en la parte superior derecha de cada panel representa el descenso de la IMF en la media de los 4 experimentos comparado con los controles. **B**, Representación del análisis estadístico de la IMF de HLA-DQ (izquierda) y HLA-DR (derecha). M±DE, n=4. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, vs el control de Mφ sin pre-estímulo (ANOVA/Dunn).

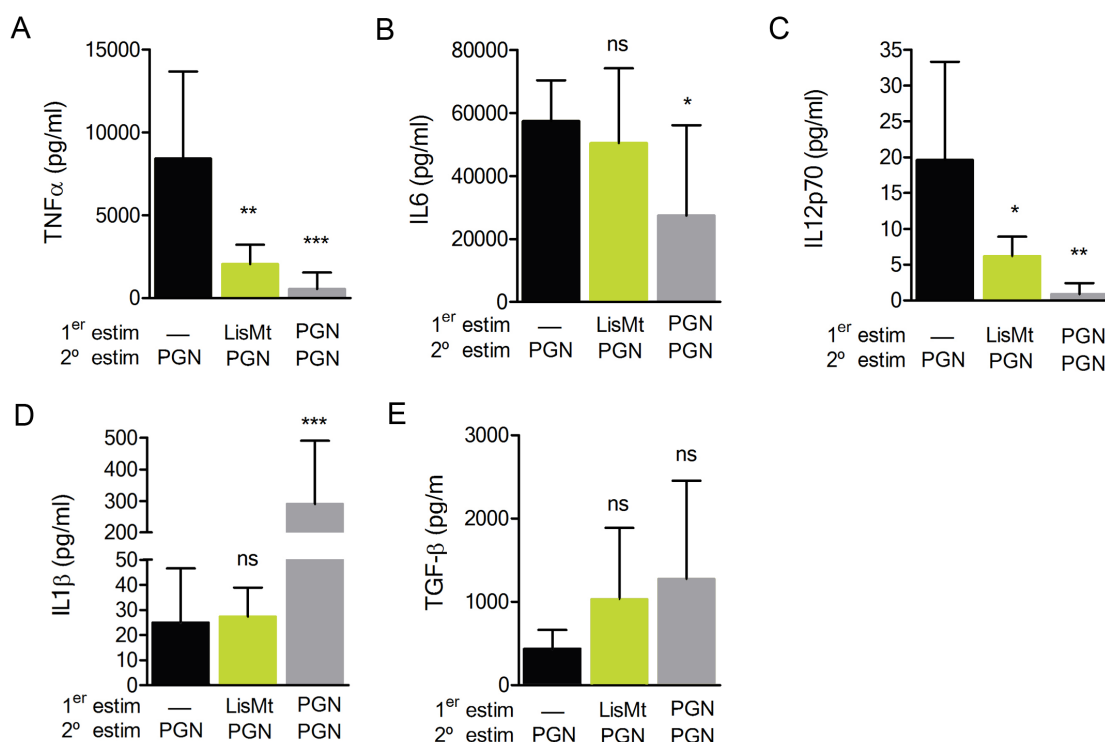
## 4.9. El lisado mitocondrial induce tolerancia cruzada parcial a TLR2, pero no a TLR3.

La tolerancia a endotoxina inducida por los DAMPs mitocondriales es un fenómeno que se engloba dentro de la denominada tolerancia cruzada o heterotolerancia. El término tolerancia cruzada se aplica a todos los casos en los que la tolerancia se desarrolla a partir de un estímulo inicial de distinta naturaleza del estímulo posterior.<sup>76</sup> El hecho de que los DAMPs mitocondriales induzcan tolerancia a la estimulación con endotoxina sugiere que hay moléculas de señalización comunes que han sido reprimidas, como MyD88, IRAK, TRAF6 o las quinasas inductoras de NF-κB. Por ello, quisimos comprobar si, además del TLR4, el conjunto de DAMPs mitocondriales producía tolerancia cruzada a otros TLRs con moléculas de señalización comunes.

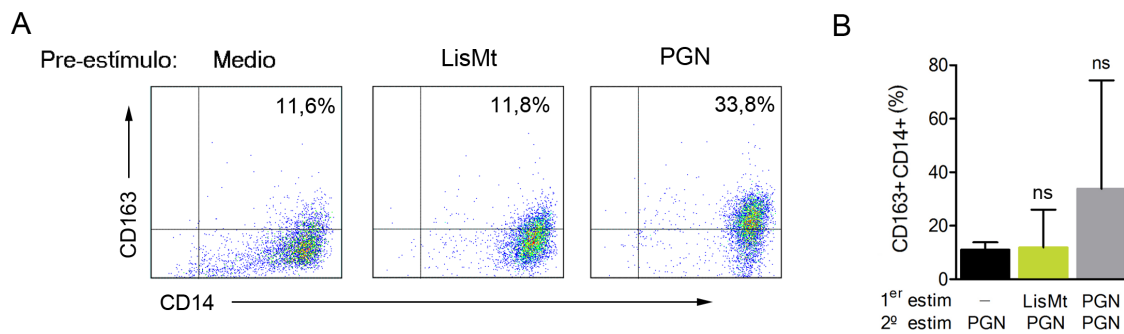
En primer lugar decidimos analizar la tolerización de otro receptor dependiente de la vía de MyD88, utilizando para ello el peptidoglicano (PGN), ligando del TLR2. Siguiendo el mismo modelo experimental descrito anteriormente para el LPS, transcurridos los 5 días de pre-incubación con el LisMt, los Mφ se estimularon con 10ng/ml de PGN. Comprobamos que, al igual que ocurría al utilizar como estímulo secundario el LPS, después de las 24h de estímulo



con el PGN se observaba una reducción significativa en la producción de las citoquinas pro-inflamatorias  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL12p70}$  en la los  $\text{M}\phi$  pre-expuestos al LisMt en comparación con las células sin pre-tratamiento (Figura R24 A y C). También se observó la reducción en la producción de estas dos citoquinas en los  $\text{M}\phi$  pre-estimulados con PGN utilizados como control positivo de tolerización. Sin embargo, a diferencia del LPS, en el caso del PGN los niveles de  $\text{IL6}$  e  $\text{IL1}\beta$  eran similares en las células pre-expuesta al LisMt y las células sin pre-tratamiento (Figura R24 B, D). En los  $\text{M}\phi$  pre-estimulados con PGN, los niveles de  $\text{IL1}\beta$  eran significativamente mayores comparado con las células sin pre-tratamiento, pero la producción de  $\text{IL6}$  era similar en ambos grupos. No encontramos diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos para la producción de  $\text{TGF-}\beta$  (Figura R24 E). Por otra parte, en nuestros ensayos no se detectaron efectos sobre la viabilidad celular debido a los tratamientos realizados (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que, aunque en menor grado en comparación con lo que sucedía para la vía de TLR4, el LisMt produce una disminución de la respuesta inflamatoria inducida por el PGN, ligando de TLR2.

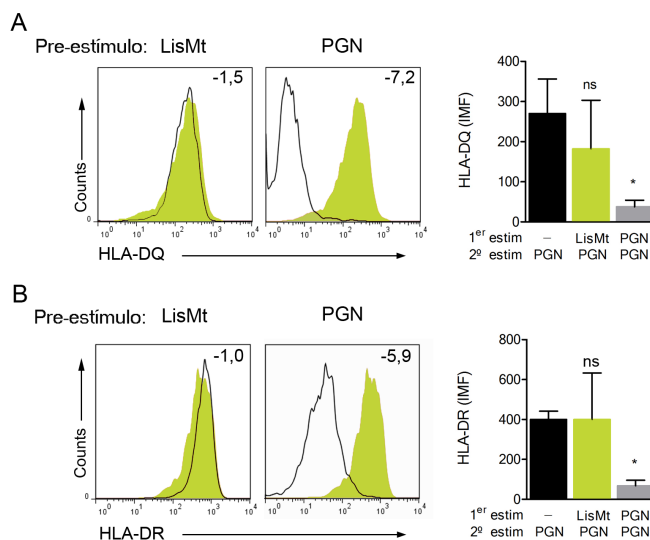


**Figura R24. La incubación de  $\text{M}\phi$  humanos con lisado mitocondrial induce tolerancia cruzada parcial al TLR2.**  $\text{M}\phi$  humanos de sangre periférica de VS estimulados durante 5 días con LisMt (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , barra verde), PGN (10ng/ml, barra gris) o sin pre-estimar (barra negra). A los 5 días los  $\text{M}\phi$  se estimularon con PGN (10ng/ml) durante 24h. **A-E**, niveles de las proteínas  $\text{TNF}\alpha$  (**A**),  $\text{IL6}$  (**B**),  $\text{IL12p70}$  (**C**)  $\text{IL1}\beta$  (**D**) y  $\text{TGF-}\beta$  (**E**) en el sobrenadante.  $\text{M}\pm\text{DE}$ ,  $n=3$ . \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , ns: no significativo, vs el control correspondiente de  $\text{M}\phi$  sin pre-tratamiento (ANOVA/Dunn).



**Figura R25. La estimulación de TLR2 en Mφ humanos pre-expuestos a lisado mitocondrial no afecta a la frecuencia de CD163+CD14+.** **A**, Gráficos Dot Blot de las frecuencias de la población CD163+CD14+ tras 24h de estímulo con PGN (10ng/ml) en Mφ pre-expuestos 5 días a LisMt (segundo panel), PGN (último panel) o sin pre-tratamiento (primer panel). Figura representativa de 3 experimentos independientes. Los valores en el cuadrante superior derecho representan la media de los 3 experimentos. **B**, Representación del análisis estadístico de las frecuencias de CD163+ CD14+. M±DE, n=3. ns: no significativo, vs el control de Mφ sin pre-estímulo (ANOVA/Dunn).

Al analizar la proporción de Mφ CD163+ CD14+, comprobamos que el estímulo con PGN no inducía cambios significativos en las células pre-tratadas con LisMt comparado con las células sin pre-tratamiento (Figura R25). Aunque el aumento en la proporción de Mφ CD163+ CD14+ en las células pre-expuestas al PGN es mayor, no es significativo debido a la gran variabilidad (Figura R25). De igual manera, no se observan cambios en los niveles en superficie de HLA-DQ y HLA-DR en las células pre-expuestas al LisMt comparado con las células sin pre-tratamiento (Figura R26). Sí es significativa la disminución en superficie de HLA-DQ y HLA-DR en el modelo de homotolerancia al PGN (Figura R26 B).



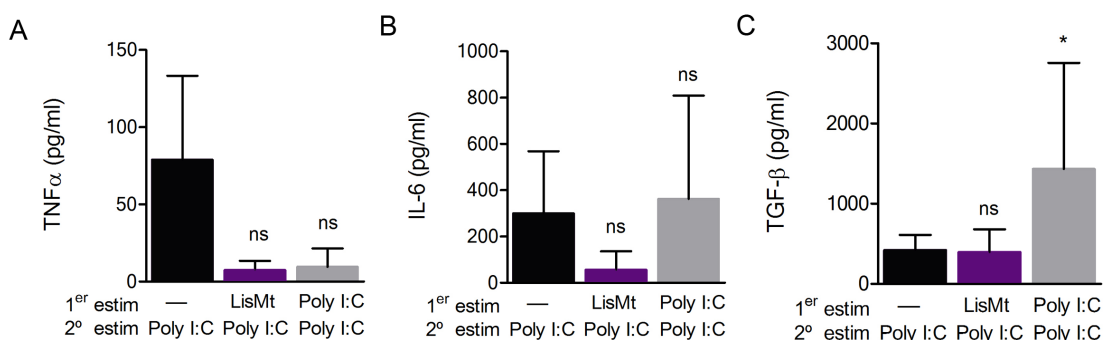
**Figura R26. La exposición al LisMt no afecta a la expresión en superficie de HLA-DQ y HLA-DR en respuesta al TLR2.**

**A-B**, Histogramas de la expresión en superficie y representación del análisis estadístico (M±DE, n=3) de HLA-DQ (**A**) y HLA-DR (**B**) tras 24h de estímulo con PGN (10ng/ml) en Mφ CD14+ pre-estimulados con LisMt (línea negra, 1er panel), PGN (línea negra, 2o panel) o sin pre-tratamiento (relleno verde, todos). Figura representativa de 3 experimentos independientes. El valor en la parte superior derecha es el descenso en la media de la IMF de los 3 experimentos comparado con los Mφ sin pre-estímulo. \*p<0,05, ns: no significativo, vs el control de Mφ sin pre-estímulo (ANOVA/Dunn).

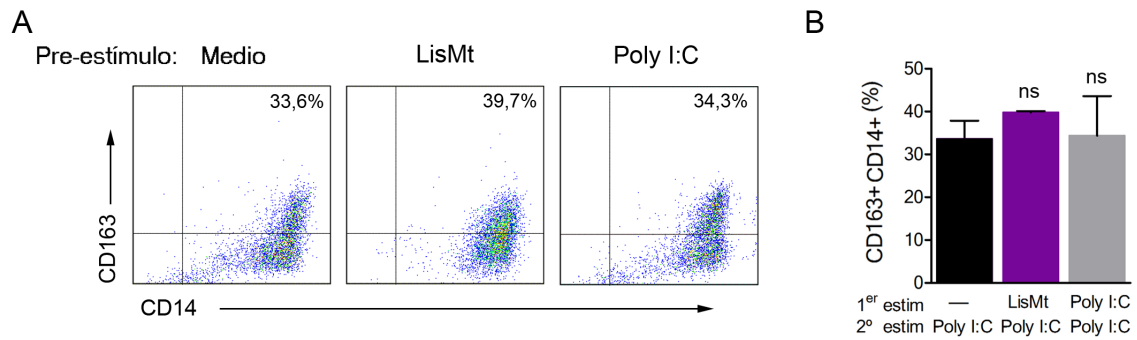
En síntesis, se puede afirmar que los DAMPs mitocondriales provocan una tolerancia cruzada al TLR2, aunque el efecto sobre la activación de TLR2 no es tan amplia como sucede con la tolerancia cruzada que hemos descrito para TLR4. En este caso no se ven afectados ni la frecuencia del marcador M2 CD163, ni las moléculas presentadoras de antígeno HLA-DQ y HLA-DR, como sí sucede cuando el segundo estímulo es el LPS (Figura R22 Y R23). Esto podría ser debido a que, en este caso, el espectro de componentes de señalización afectados sea menor que para la vía de TLR4.

A continuación quisimos comprobar si una vía independiente de MyD88 también se vería afectada por la exposición a los DAMPs mitocondriales. Utilizamos el ácido poliinosínico:policitidílico (Poly I:C), un ligando sintético de TLR3 que mimetiza el ARN viral.<sup>10</sup> El TLR3 es el único TLR que no señala a través de MyD88, sino que señala a través de TRIF, molécula asociada también a la señalización de TLR4<sup>7</sup> y que está involucrada en la regulación de la homotolerancia al TLR4 inducida por el LPS.<sup>27</sup>

Siguiendo nuestro modelo experimental, tras los 5 días de pre-incubación con el LisMt, los Mφ se estimularon con 5μg/ml de Poly I:C durante 24h. En este caso no encontramos diferencias significativas en la producción de las citoquinas pro-inflamatorias TNFα o IL6 entre los distintos tratamientos (Figura R27 A y B). La incubación con el Poly I:C no indujo niveles detectables de IL12p70 e IL1β (datos no mostrados). La producción del factor anti-inflamatorio TGF-β era significativamente mayor en los Mφ pre-estimulados con Poly I:C, pero no encontramos diferencias entre las células pre-tratadas con el LisMt y las células sin pre-tratamiento (Figura R27 C). Estos resultados indican que el LisMt no produce cambios en la activación del TLR3 por el Poly I:C.

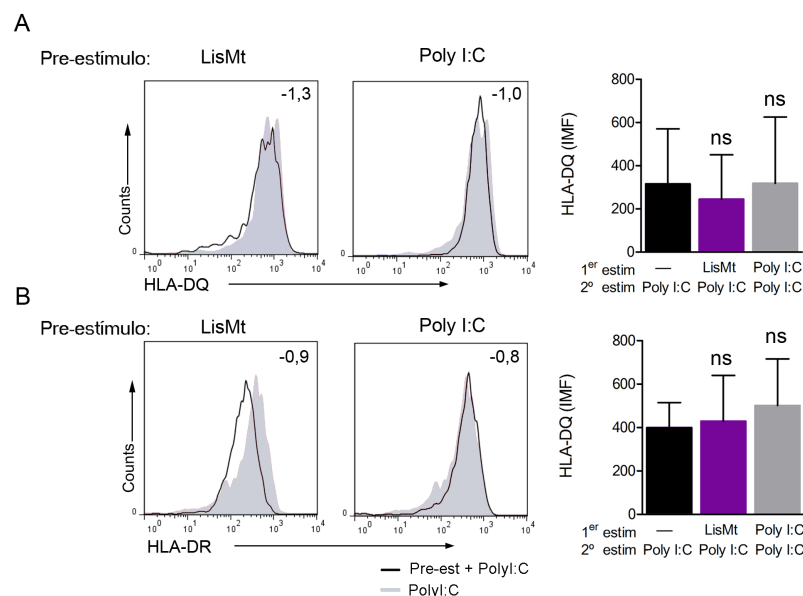


**Figura R27. La incubación de Mφ con lisado mitocondrial no induce tolerancia cruzada al TLR3.** Mφ humanos de sangre periférica de VS estimulados durante 5 días con LisMt (20μg/ml, barra morada), Poly I:C (5μg/ml, barra gris) o sin pre-estimar (barra negra). A los 5 días se estimularon los Mφ con Poly I:C (5μg/ml, 24h). **A-E**, niveles de las proteínas TNFα (A), IL6 (B) y TGF-β (C) en el sobrenadante. M±DE, n=3. \*p<0,05, ns: no significativo, vs el control de Mφ sin pre-estímulo (ANOVA/Dunn).



**Figura R28. La incubación de Mφ humanos con lisado mitocondrial no altera la frecuencia de CD163 en respuesta al ligando de TLR3.** **A**, Gráfico Dot Blot de la frecuencia de la población CD163+ CD14+ tras 24h de estímulo con Poly I:C (5μg/ml) en Mφ pre-expuestos 5 días a LisMt (segundo panel), a Poly I:C (último panel) o sin pre-tratamiento (primer panel). Figura representativa de 3 experimentos independientes. El valor en el cuadrante superior derecho es la media de los 3 experimentos. **B**, Representación del análisis estadístico de las frecuencias de CD163+ CD14+. M±DE, n=3. ns: no significativo, vs el control de Mφ sin pre-estímulo (ANOVA/Dunn).

Por otra parte, tanto la proporción de Mφ CD163+ CD14+ (Figura R28) como los niveles en superficie de HLA-DQ y de HLA-DR (Figura R29) no sufrían cambios significativos en respuesta al estímulo con el Poly I:C entre las células pre-tratadas con LisMt comparado con las células sin tratamiento. Cabe destacar que el estímulo simple con Poly I:C (Figura R28, Primer panel) induce niveles similares de células CD163+ CD14+ que las dobles estimulaciones con LPS o con PGN (Figuras R22, R25).



**Figura R29. La pre-incubación de Mφ humanos con LisMt no afecta a la expresión de HLA-DQ y HLA-DR en respuesta al TLR3.** Histogramas de la expresión en superficie y representación del análisis estadístico de la IMF (M±DE, n=3) de HLA-DQ (**A**) y HLA-DR (**B**) tras 24h de estímulo con Poly I:C (5μg/ml) en Mφ CD14+,

pre-expuestos a LisMt (línea negra, primer panel) o Poly I:C (línea negra, segundo panel), y Mφ sin pre-tratamiento (relleno gris, todos los paneles). n=3 Figura representativa de 3 experimentos independientes. El valor en la parte superior derecha del panel representa el descenso de la IMF en la media de los 3 experimentos comparado con los controles sin pre-estímulo. ns: no significativo, vs el control de Mφ sin pre-estímulo (ANOVA/Dunn).

En conjunto, la activación del TLR3 por el Poly I:C no se vio afectada por el pre-tratamiento con el LisMt. Sin embargo, los Mφ expuestos al LisMt sí muestran una reducción en la secreción de citoquinas y una disminución de las moléculas de superficie presentadoras de antígenos en respuesta a la estimulación con agonistas del TLR4 y del TLR2 (LPS y PGN, respectivamente). Esto indica que la supresión inducida por la pre-exposición al LisMt no afecta a todos los TLRs. En el contexto de los pacientes de SCA, los datos *in vitro* sugieren que en pacientes con elevados niveles de ADNmt en circulación cabría esperar una afectación de la respuesta frente a agentes bacterianos tanto Gram negativos como positivos y sin embargo, probablemente no se afecte la respuesta a virus.

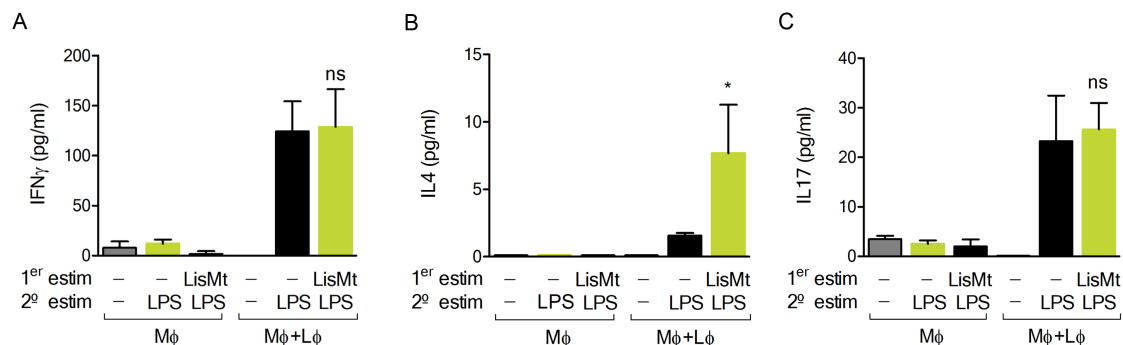
#### 4.10. Los Mφ expuestos a lisado mitocondrial afectan la respuesta de linfocitos T CD4.

Dado que hemos observado que en presencia de los DAMPs mitocondriales la respuesta innata se polariza, y que en pacientes de SCACEST, en los que hay mayores niveles de ADNmt, el perfil de expresión génica indicaba una respuesta anti-inflamatoria tanto del sistema inmune innato como del adaptativo, decidimos estudiar el efecto de los DAMPs mitocondriales en la respuesta adaptativa. Cabe destacar que se ha comprobado que la estimulación del sistema inmune por los DAMPs endógenos no depende de la respuesta adaptativa.<sup>156</sup> Sin embargo, los Mφ no sólo son efectores de la respuesta innata, sino que también están involucrados en el inicio y la regulación de las respuestas adaptativas. Son capaces de influenciar la producción de citoquinas asociadas a una respuesta Th1, Th2 ó Th17 de los linfocitos. Los Mφ con fenotipo M1, a través de la secreción de citoquinas y quimioquinas como la IL12, el CXCL9 o el CXCL10, promueven la polarización y el reclutamiento de linfocitos Th1.<sup>190</sup> Los linfocitos Th1 se caracterizan por la secreción principalmente de IFN-γ, IL2 y TNFα y son importantes en la defensa del organismo frente a un gran número de patógenos y en enfermedades patogénicas inflamatorias.<sup>211, 340</sup> Por el contrario, los Mφ con fenotipo M2 secretan citoquinas y quimioquinas como la CCL17, CCL22 o la CCL24, que son reconocidas por los receptores CCR4 y CCR3 presentes en células Th2 o en Treg.<sup>190</sup> Los linfocitos Th2 secretan IL4 e IL10 y están asociados a la respuesta inmune humoral y a las repuestas alérgicas.<sup>211, 340</sup> Los Mφ promueven la polarización hacia Th17 mediante la secreción de IL-1β, IL-6, IL-23 o TGF-β1.<sup>157</sup> Las células Th17 producen principalmente IL17 y promueven respuestas pro-inflamatorias a bacterias y hongos, así como enfermedades autoinmunes.<sup>5, 123, 242</sup>

Con el objetivo de determinar el tipo de respuesta que los Mφ expuestos a los DAMPs mitocondriales eran capaces de inducir en los linfocitos, co-cultivamos linfocitos heterólogos T CD4+ purificados con Mφ que habían sido pre-condicionados siguiendo el modelo experimental

descrito anteriormente (Figura R16 A). Así, se generaron por un lado Mφ con perfil M2 inducido por la incubación con LisMt mas un segundo estímulo con LPS, así como Mφ con perfil M1 inducido por la estimulación con LPS 24h. De este modo, transcurridos los tratamientos se lavaron los Mφ y se co-cultivaron durante 4 días con las células T CD4+, pasados los cuales se determinó la producción de citoquinas en el sobrenadante (Figura R30).<sup>159</sup>

Comparado con las células T CD4+ co-cultivadas con los Mφ con perfil M1, las células T CD4+ cocultivadas con los Mφ pre-expuestos al LisMt presentaban un marcado aumento en la producción de IL4 (Figura R30 B), mientras que los niveles de IFN-γ e IL17 eran similares en ambos grupos (Figura R30 A y C). En los cultivos de Mφ solos no se daba una producción significativa de IFNγ, IL4 ó IL17. Estos resultados muestran que los Mφ con perfil M2, además de inducir la producción de IFN-γ e IL17 como los Mφ con perfil M1, promueven una mayor secreción de IL4 en linfocitos T CD4+ comparado con los Mφ M1. Esto sugiere que los Mφ polarizados hacia una respuesta M2 por los DAMPs mitocondriales generan una respuesta mixta pero podrían estar induciendo un cambio hacia la respuesta Th2 en los linfocitos.



**Figura R30. Los Mφ pre-expuestos al lisado mitocondrial provocan un aumento de producción de IL4 en los linfocitos T CD4.** Mφ humanos de sangre periférica de VS estimulados durante 5 días con LisMt (20μg/ml, barra verde) o sin estimular (barras negra y gris) y a los 5 días estimulados con LPS (10ng/ml, barras negra y verde) durante 24h. Se retiró el sobrenadante y se añadieron linfocitos T CD4+ en una proporción 1:5 (Mφ: Lφ). A los 4 días se analizó la producción de IFNγ (A), IL4 (B) e IL17 (C) en el sobrenadante de los cocultivos (derecha) y en Mφ solos (izquierda). M±DE, n=3. \*p<0,05, ns: no significativo, vs el control del cocultivo con Mφ sin pre-estímulo+LPS (ANOVA/Dunn).

## 4.11. Los pacientes con SCA que presentan monocitos de sangre periférica con fenotipo M2 tienen una tasa mayor de infecciones posteriores.

El conjunto de resultados obtenidos *in vitro*, en los que comprobamos que la exposición de M $\phi$  a los DAMPs mitocondriales provoca una reprogramación hacia un estado refractario, refleja las condiciones clínicas descritas en los pacientes de SCACEST, en los cuales los niveles elevados de ADNmt en el suero de pacientes correlacionaban con el fenotipo M2 de sus M $\phi$ . Esta polarización a M2 de los M $\phi$  de sangre periférica observada en los pacientes con IAM (SCASEST y SCACEST) podría predisponer a un mayor riesgo de infecciones tal y como ocurre en otras patologías como la sepsis, donde también se desarrolla un estado refractario o de tolerancia a endotoxinas del sistema inmune innato.<sup>29, 48</sup>

Para poder valorar la tasa de infecciones posteriores al episodio coronario, se llevó a cabo un estudio de seguimiento de todos los pacientes reclutados en este trabajo. De los 75 pacientes, 7 fueron readmitidos en el hospital con una infección en los 3 meses siguientes al reclutamiento (Tabla R1). Todos los casos estaban clasificados como SCACEST y SCASEST, un 19% y un 12% de cada grupo respectivamente. Cabe destacar que las infecciones estaban causadas tanto por bacterias Gram negativas como positivas, pero no se detectaron infecciones víricas tal y como se esperaba de los resultados *in vitro*.

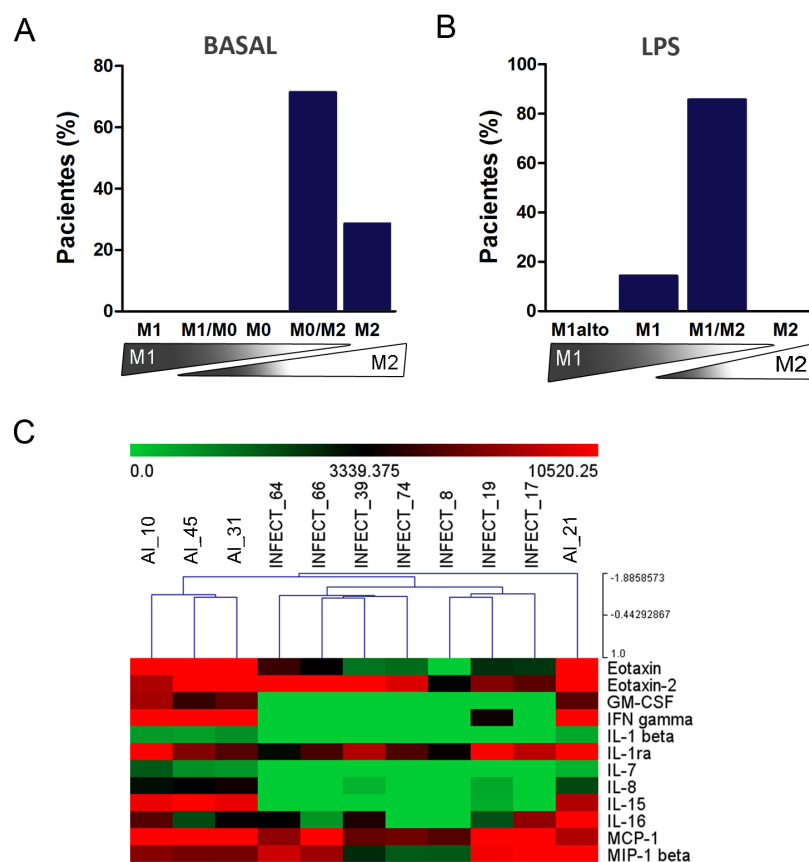
Relacionando las infecciones subsiguientes con el índice M1/M2 descrito anteriormente, a nivel basal, los M $\phi$  de todos los pacientes con infección posterior estaban clasificados como M2 o M2 intermedio en el momento de su entrada al estudio (Figura R31 A). De igual manera, tras el estímulo con LPS, los M $\phi$  de todos los pacientes que padecieron una infección subsiguiente presentaban una respuesta M2 intermedia al ser reclutados (Figura R31 B).

Para analizar con más detalle la respuesta inflamatoria en estos pacientes en el momento del reclutamiento, se midieron los niveles de distintas proteínas inflamatorias en el plasma, tanto en los pacientes que posteriormente se infectaron, como en una selección de pacientes que no sufrieron infecciones y se clasificaban como AI (Figura R31 C). Con este objetivo se utilizó un array de anticuerpos (Quantibody Human Inflammation Array 3) y se realizó el análisis estadístico mediante el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ), el cual permite hacer un agrupamiento jerárquico no supervisado, con el objetivo de analizar la similitud o diferencia entre los pacientes.

Nuestros datos muestran que todos los pacientes que posteriormente padecieron una infección, excepto uno, se agrupan y que este grupo de pacientes presenta, en conjunto, menores niveles en plasma de proteínas pro-inflamatorias comparado con los pacientes del grupo AI.

Esto apoya los datos obtenidos al estudiar sus M $\phi$  de sangre periférica, reflejando que en estos pacientes existe un fenotipo refractario.

En resumen, estos datos sugieren que los pacientes con daño coronario están polarizados hacia una respuesta alternativa y, por ello, podrían ser más proclives ser colonizados por agentes patógenos de origen bacterianos.



**Figura R31. La tasa de infecciones posteriores al IAM es mayor en pacientes con M $\phi$  de sangre periférica con fenotipo M2.** Estudio de seguimiento de todos los pacientes de SCA reclutados para valorar la tasa de infecciones posteriores al alta hospitalaria tras el episodio coronario, comparado con el Índice M1/M2 de los M $\phi$  de estos pacientes en el momento del reclutamiento. **A**, Índice M1/M2 a nivel basal. **B**, Índice con el estímulo de LPS (3h, 10ng/ml). **C**, Análisis de proteínas inflamatorias en el plasma del grupo de pacientes con infecciones posteriores y del grupo AI, recolectado en el primer reclutamiento, utilizando un array de anticuerpos. Agrupación jerárquica no supervisada en base a la IMF (correlación de Pearson). El color verde representa proteínas con nivel bajo, el rojo alto y el negro intermedio.





## 5. DISCUSIÓN



El SCA es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Los mecanismos que desencadenan estos eventos son diversos, sin embargo, hay cada vez más evidencias que apoyan el papel patogénico de la inflamación en el desarrollo y progresión del SCA.<sup>9, 158, 223</sup> Por este motivo, para este trabajo en primer lugar se evaluaron los cambios en el perfil de expresión génica después del IAM en el conjunto de las CMSP mediante la técnica de microarrays. Asimismo, estudiamos en mayor profundidad los efectos de esta inflamación sistémica a medio y largo plazo en los Mφ de sangre periférica, ya que juegan un papel central en la desestabilización de la placa y en la inflamación sistémica.<sup>191, 210</sup>

Al analizar la similitud de los pacientes de cada grupo concluimos que la expresión génica de las CMSP es suficiente para distinguir entre SCACEST y AI (Figura R1). Así, en el ACP apreciamos que el primer componente principal (eje vertical), que es el que tiene más importancia en la varianza total, separa fundamentalmente los pacientes con SCACEST de los pacientes de AI, mientras que los pacientes de SCASEST se reparten a ambos lados del eje (Figura R1A). De forma similar, en el análisis jerárquico también se observa una separación de los pacientes de AI y de SCACEST con un 100% de apoyo estadístico (Figura R1B). Sin embargo, los pacientes de SCASEST no se agrupan juntos y forman dos grupos mixtos, con SCACEST por un lado y con AI por otro. Esta distribución de SCASEST, tanto en el gráfico de ACP como en el dendrograma, refleja la existencia de cierta similitud con los otros dos grupos, lo que sugiere que estos pacientes ocuparían un lugar intermedio entre la AI y el SCACEST. Estos resultados están en concordancia con la idea propuesta por Willerson y colaboradores de que la AI, el SCASEST y el SCACEST representan un continuo fisiopatológico.<sup>323, 324</sup> Por tanto, nuestros datos indican que los perfiles de expresión permiten incluso apreciar cierto grado de relación entre los grupos. El hecho de que los pacientes de SCASEST no conformaran un grupo homogéneo nos llevó a mantener la comparación sólo entre SCACEST y AI para los análisis posteriores del perfil de expresión.

El gran volumen de datos que se generan en un experimento de microarrays muchas veces frustra los intentos de extraer información de utilidad. Por este motivo, los análisis *in silico* como el utilizado para este trabajo son herramientas muy útiles para identificar mecanismos a partir de cambios en la expresión génica.<sup>43, 311</sup> Los resultados del análisis de expresión revelaron que la expresión génica de los leucocitos se altera de forma significativa después de un IAM. Encontramos genes expresados diferencialmente en SCACEST implicados en la patogénesis de la aterosclerosis (OLR1, MMP2 y MMP14), en la remodelación (VEGFA, SERPIN1 o PLA2), así como en la respuesta inmune de leucocitos (IL8, IL4, IL10, CXCL9). Por otro lado, el análisis también reveló que algunos genes relacionados con el cáncer estaban presentes en las rutas de señalización más significativas. Ninguno de los pacientes estudiados tenía diagnosticada esta enfermedad, por lo que estos resultados se atribuyen al hecho de que multitud de procesos celulares se han asociado al cáncer

y por ello es muy probable que en un conjunto de genes aparezcan muchos implicados a esta enfermedad.

Debido al papel de los leucocitos en el desarrollo y progresión del SCA, y teniendo en cuenta que los pacientes de SCACEST tienen mas lesiones en los vaos, más estenosis y mayor necrosis que los pacientes de AI (Tabla R1), esto se debe reflejar en las CMSP. Efectivamente, encontramos numerosos genes asociados a una mayor aterosclerosis y lesiones en los vasos que estaban diferencialmente expresados en SCACEST (Tabla A3). Procesos como la estenosis aparecen también asociados al conjunto de genes alterados en las CMSP de los pacientes de SCACEST (Tabla A5, Figura R2). En esta línea, el gen con mayor sobre-expresión, OLR1, codifica para el receptor scavenger o depurador LOX-1 (Tabla R3). Este receptor está implicado en múltiples fases de la disfunción vascular, incluyendo la formación y desestabilización de la placa aterosclerótica. Los niveles del receptor soluble (sLOX-1) aumentan en SCA, se han asociado con la prognosis del SCA<sup>163</sup> y reflejan la inestabilidad de la placa.<sup>127</sup> Además, polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en este gen se han relacionado con la susceptibilidad de padecer un IM.<sup>314</sup>

Por otro lado, la hipoxia que se produce por la isquemia y la necrosis del miocardio no sólo está afectando al tejido del corazón, ya que en el análisis de las vías de señalización afectadas en las CMSP de los pacientes de SCACEST encontramos la vía de HIF1 $\alpha$  (Figura R4). Se ha descrito que la isquemia severa del miocardio lleva a la acumulación de HIF1 $\alpha$ , que a su vez activa la expresión de factores de crecimiento iniciando el proceso de angiogénesis.<sup>21, 46, 252</sup> De este modo, en concordancia con la hipoxia severa asociada al IAM, una de las funciones más significativamente alteradas en las CMSP de los pacientes de SCACEST es la angiogénesis (Tabla A3). Se ha descrito que en respuesta a esta hipoxia tisular un gran número de M $\phi$  es reclutado de la circulación hacia los tejidos hipóxicos, donde promueven la angiogénesis al estimular la secreción de metaloproteinasas de la matriz y de factores angiogénicos. Así, según nuestro análisis, 18 de los 28 genes con funciones que afectan a la angiogénesis tienen un sentido de su expresión consistente con el aumento de este proceso (Figura R5, Tabla A3). Encontramos factores pro-angiogénicos como IL8,<sup>82, 284</sup> metaloproteinasas de la matriz (MMP2 y MMP14)<sup>109, 134, 138</sup> o el VEGFA<sup>218, 274</sup> sobre-expresados en SCACEST (Tabla A1). En este mismo contexto, entre los genes con mayor expresión en SCACEST encontramos la proteína similar a angiopoyetina 4 (ANGPTL4; Tabla R3), un gen que se induce por hipoxia en las enfermedades isquémicas.<sup>168</sup> Además, su aumento en SCACEST concuerda con estudios recientes en los que se demuestra que la expresión de la ANGPTL4 se induce en respuesta al IAM.<sup>103</sup>

En conjunto, el análisis IPA es capaz de identificar las diferencias clínicas entre los grupos, lo que refuerza el uso de la comparación entre SCACEST y AI para detectar los efectos del IAM en la respuesta de las CMSP. Además, esta metodología permite predecir la posible progresión de la enfermedad. La necrosis del miocardio provocada por la isquemia desencadena una reacción

inflamatoria que limpia la zona de células muertas y restos de la matriz, activando vías de señalización para la cicatrización. Esta remodelación cardíaca está unida a la progresión hacia el fallo cardíaco y se asocia a una peor prognosis en los pacientes que sobreviven a un IM.<sup>322</sup> Prácticamente todos los aspectos de la remodelación ventricular han sido asociados a la respuesta inflamatoria.<sup>96</sup> Así, determinados productos resultantes de la necrosis son liberados iniciando la respuesta inmune innata al activar vías de señalización como los TLRs o el complemento.<sup>245</sup> La activación del sistema inmune a su vez induce la liberación de múltiples mediadores como CCL2, TNF $\alpha$ , CSF-1 o SDF-1, de modo que las células inflamatorias son atraídas a la zona dañada del miocardio.<sup>245</sup> Por ello, en el análisis del perfil de expresión encontramos alteraciones en numerosos procesos relacionados con la respuesta inflamatoria. Es más, los procesos más aumentados en las CMSP de los pacientes de SCACEST están relacionados con el reclutamiento de células del sistema inmune, como la migración, la infiltración o la quimiotaxis de leucocitos (Figura R7 y Tabla A6). No es de extrañar que se hayan identificado estos procesos más aumentados en SCACEST frente a AI, ya que en los pacientes de IAM la necrosis y el daño isquémico son mucho mayores y por tanto las señales que regulan la infiltración y migración de células inflamatorias serán más intensas.

En este contexto, encontramos diversos genes implicados en la migración e infiltración de leucocitos. En este sentido, dos de los genes con mayor expresión en SCACEST, la fibronectina (FN1) y WNT5A, están implicados en el aumento de la migración de leucocitos (Tabla A6).<sup>110, 206, 247</sup> Wnt5a, proteína prototípica de la señalización independiente de  $\beta$ -catenina, se expresa en macrófagos activados y células presentadoras de antígeno<sup>32</sup> y su expresión es necesaria para la migración y señalización mediada por CXCL12-CXCR4 en linfocitos T de ratón. Además, la sobre-expresión de esta proteína aumenta la apoptosis de células T *in vitro*, por lo que Wnt5a también está asociado al aumento de la apoptosis de leucocitos mononucleares en los pacientes de SCACEST que prevé el análisis (Tabla A6).<sup>174</sup> Destaca también la sobre-expresión de IL8 en SCACEST, que promueve principalmente la migración de neutrófilos,<sup>337</sup> y se ha descrito que aumenta después del IM en modelos animales.<sup>135 161</sup> El hecho de que esté sobre-expresada en nuestros pacientes podría indicar el inicio de la fase reparadora, ya que la expresión de IL8 aumenta en las fases iniciales de la reparación y disminuye cuando la migración celular está completada.<sup>53</sup> También está aumentada la expresión de la quimioquina CXCL2, una proteína quimioatrayente de leucocitos polimorfonucleares.<sup>326</sup> El aumento de IL8 y CXCL2 concuerda con la sobre-expresión de ORL-1(LOX-1) en los pacientes de SCACEST mencionada anteriormente. Se ha descrito que LOX-1 se expresa en M $\phi$ <sup>335</sup> y que la asociación del oxLDL a este receptor induce la activación de NF-kB<sup>185</sup> que, a su vez, aumenta la producción de estas quimioquinas.

Por otro lado, en el análisis del perfil de expresión identificamos genes asociados a la remodelación estructural del miocardio implicados en alteraciones de la matriz de colágeno (FN1),

la degradación de la matriz extracelular (MMP14, MMP2) o la angiogénesis (VEGFA).<sup>91, 224</sup> También sería el caso del gen PTGES, asociado en el análisis a funciones como la dilatación de la cámara del corazón (Tabla A4). Según un estudio reciente, después del IM la PTGES cataliza la biosíntesis de PGE<sub>2</sub> y su delección provoca hipertrofia excéntrica de los cardiomiocitos y dilatación del ventrículo izquierdo.<sup>66</sup> Lo más interesante es que según los autores de este estudio, la fuente de sobre-expresión y producción de PGE<sub>2</sub> después del IM serían las células inflamatorias, lo que apoya nuestra observación de que la PTGES está sobre-expresada en las CMSP de los pacientes de IAM (Tabla R3) y podría indicar el inicio de la reparación del miocardio infartado en esta cohorte de pacientes.

Por otro lado, hay cada vez más evidencias que sugieren que la respuesta inflamatoria persistente participa en la patogénesis de la remodelación ventricular adversa después del IM. Por ello es crucial la inhibición de la síntesis de quimioquinas y citoquinas después del pico inicial para una correcta reparación del miocardio. En este contexto, los Mφ en los pacientes de IAM presentan una respuesta M2 (Figura R8), lo que podría indicar que en estos pacientes la acción reguladora de los Mφ M2 atenuaría la remodelación ventricular, mejorando por tanto la función cardíaca después del IAM. En este sentido, se ha descrito que la IL10, sobre-expresada en los pacientes de SCACEST (Tabla A1, Figura R8), juega un papel importante en las fases posteriores al IM. Entre otras funciones, contribuye a la restauración del miocardio infartado promoviendo la degradación y remodelación de la matriz extracelular<sup>165, 216</sup> y su aumento se ha correlacionado positivamente con la fracción de eyección del ventrículo izquierdo.<sup>145</sup>

Por otro lado, entre las principales funciones identificadas por el análisis IPA encontramos la disminución de la dilatación de la cámara del corazón, donde 5 de los 7 genes implicados tienen una expresión que disminuiría la dilatación (Figura R5 y Tabla A4). Estos datos, junto con el hecho de que el sistema inmune parece estar cambiando hacia una respuesta anti-inflamatoria, algo que favorece la reparación de tejidos, indicarían una buena progresión de la enfermedad en la cohorte de pacientes de SCACEST analizados. Por otro lado, niveles elevados de BNP, como los detectados en los pacientes de SCACEST (Tabla R2), se han correlacionado con la dilatación ventricular y la remodelación en pacientes de SCA.<sup>64, 188</sup> Por tanto, en futuras investigaciones sería interesante poder complementar estos resultados con estudios en modelos animales de los Mφ infiltrados en las zonas isquémicas para determinar cómo la respuesta de los Mφ en sangre está relacionada con las respuestas en el tejido y si un perfil M2 en circulación influye positiva o negativamente en la remodelación cardíaca adversa.

Uno de los resultados más interesantes del análisis del perfil de expresión es que en las CMSP de los pacientes de SCACEST se estaba produciendo una regulación negativa de la respuesta inmune (Figura R7). Se ha descrito que la ruptura de la placa aterosclerótica desencadena una respuesta inflamatoria local, lo cual provoca una respuesta inflamatoria sistémica.<sup>96, 280</sup> La rotura de la placa

se ha producido tanto en los pacientes de SCACEST como en AI, lo que sugiere que la respuesta pro-inflamatoria sistémica ha sucedido en todos los pacientes. Por otro lado, el daño en los tejidos provocado por el IAM desencadena una respuesta pro-inflamatoria a corto plazo,<sup>130</sup> y este evento sólo ha sucedido en los pacientes de SCACEST. Por tanto, las señales liberadas a en la respuesta inicial al IAM deben estar reprogramando la respuesta posterior de las CMSP en los pacientes de SCACEST, ya que en estos pacientes el perfil de expresión génica de las CMSP 24-36h después del IAM muestra un componente anti-inflamatorio. Estos resultados se confirmaron con los resultados del análisis *in vitro* de los Mφ de estos pacientes, que mostraban una respuesta anti-inflamatoria predominante (Figura R8 y R9). En este contexto, en un trabajo previo de nuestro laboratorio se demostró que, después de 1-3 horas del IAM, los Mφ de sangre periférica de los pacientes de SCA presentaban un perfil pro-inflamatorio, con sobre-expresión de TNFα,<sup>69</sup> pero al mismo tiempo estos Mφ tenían altos niveles del regulador negativo IRAK-M, aportando una retroalimentación negativa para la respuesta pro-inflamatoria, un paradigma clásico de la tolerancia a endotoxinas.<sup>83, 180</sup> Estos resultados ya apuntaban a un posible cambio en la respuesta de los Mφ tras la inflamación inicial. Esta reprogramación se confirmó en este trabajo al comprobar que tanto el conjunto de las CMSP, como los Mφ de sangre periférica mostraban un perfil predominantemente anti-inflamatorio 24-36 horas después del episodio isquémico (Figuras R7-9).

La regulación negativa de la respuesta de leucocitos en SCACEST está asociada a la disminución de la expresión de genes pro-inflamatorios como IL32, IL34, FCER1A o CXCL2, y a la sobre-expresión de genes implicados en la respuesta anti-inflamatoria como IL10, PPARG, VEGFA, SERPINE1 (PAI-1) o PLA2 (Tabla A7). En particular, la vía de señalización y producción de IL12 aparece regulada negativamente en las CMSP de los pacientes de IAM (Figura R6). Un excesivo aumento de IL12, proteína pro-inflamatoria que actúa principalmente activando linfocitos T y células NK, resulta en un incremento del daño en los tejidos y en citotoxicidad.<sup>306</sup> Por este motivo, los mecanismos que limitan la producción de esta citoquina son esenciales para prevenir el daño producido por el sistema inmune. Por un lado, encontramos sobre-expresado el factor de transcripción JUN, que activa la expresión de IL12.<sup>186</sup> Sin embargo, la mayoría de los genes asociados a la ruta de síntesis de IL12 que aparecen sobre-expresados en SCACEST, PPARG,<sup>62, 117</sup> IL10<sup>17</sup> o AKT3<sup>101</sup> (Tabla R3), actúan como reguladores negativos inhibiendo la producción de IL12.

Además de inhibir la producción de IL12, PPARG e IL10 están asociados a otros procesos de regulación de leucocitos. PPARG codifica para la proteína PPARγ que actúa como modulador negativo de la respuesta de los Mφ.<sup>139, 259</sup> Además, se ha demostrado que los agonistas de PPARγ inducen la polarización hacia M2.<sup>35</sup> La IL10 es una citoquina característica de la respuesta M2 de los Mφ<sup>29</sup> que posee potentes propiedades anti-inflamatorias porque disminuye la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias como IL12, IL1β, TNF-α o IL6.<sup>17, 212</sup> Además de estas funciones, en el contexto del SCA,



la IL10 es capaz de inhibir la apoptosis, con lo que contrarresta los daños en el miocardio producidos por la reperfusión.<sup>234</sup> Dentro de las CMSP, los principales productores de IL10 son los linfocitos B, los linfocitos Th2 y los Mφ activados M2.<sup>215</sup> Esto contrasta con la disminución de IL4 y de MAF, factor de transcripción que activaría la transcripción de IL4 en linfocitos T (Tabla R4), por lo que parece que la respuesta de los linfocitos no es mayoritariamente Th2, y se podría asumir que la expresión de IL10 viene principalmente de los Mφ. Esto se confirmó en el estudio posterior del perfil de los Mφ en el que observamos que, efectivamente, la IL10 está sobre-expresada en Mφ de sangre periférica de pacientes de SCACEST frente a AI (Figura R8).

Algunos genes con sobre-expresión en SCACEST no tienen una clasificación tan clara como promotores de una respuesta pro o anti-inflamatoria. Es el caso de la proteína codificada por el gen PTGES, que tiene efectos contradictorios como regulador de la respuesta inflamatoria.<sup>125</sup> Esta amplitud de funciones se ve reflejada en los resultados que se obtuvieron en los análisis de IPA, ya que PTGES aparece relacionado con la mayoría de categorías funcionales y de vías de señalización (Tablas R5, A4, A4 y A6). Como se ha mencionado anteriormente, PTGES cataliza la biosíntesis de PGE<sub>2</sub> y las propiedades pro-inflamatorias de la PGE<sub>2</sub> son la razón del uso clínico de los inhibidores de COX.<sup>88</sup> Sin embargo, la PGE<sub>2</sub> también tiene propiedades anti-inflamatorias sobre el sistema inmune innato. Media en la neuroprotección inducida por bradiquinina y bloquea la síntesis de citoquinas mediada por LPS y ATP en cultivos de microglía.<sup>41, 229</sup> Además, en un modelo de neuro-inflamación se ha descrito que el aumento de PTGES por la inflamación inicial prepara para una regulación negativa por la PGE<sub>2</sub> que limitaría la síntesis de mediadores inflamatorios durante la inflamación crónica.<sup>36</sup> Esto mismo podría estar ocurriendo en los pacientes de SCACEST. La inflamación inducida por el IAM provoca la sobre-expresión de PTGES (Tabla R3), y esto podría generar a través de la PGE<sub>2</sub> la regulación negativa de la respuesta inflamatoria que se predice en el análisis de IPA.

En resumen, el análisis *in silico* del perfil de expresión de las CMSP de los pacientes de SCACEST mostró un perfil inflamatorio dirigido a una atenuación de la respuesta pro-inflamatoria, un paso necesario para la correcta resolución de la inflamación y para la entrada en la fase de reparación del daño producido por el IAM. El análisis apuntaba a una regulación negativa de la respuesta de linfocitos, neutrófilos y macrófagos (Figura R7). Esta hipótesis está respaldada por estudios recientes que describen un papel similar de la inhibición de los TLRs y de la señalización de citoquinas después de la isquemia cerebral.<sup>143</sup> En la Figura D1 se muestra un esquema de las fases de la respuesta inflamatoria post-IAM en los Mφ de sangre periférica, así como en las CMSP, en base a los resultados obtenidos tanto en el estudio previo del laboratorio<sup>69</sup> como en el presente trabajo.

En vista de estos resultados, nuestro siguiente paso fue comprobar esta reprogramación de la respuesta inmune específicamente en los Mφ, dado su papel central en la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa.<sup>30</sup> Para estos estudios se incluyeron además pacientes del

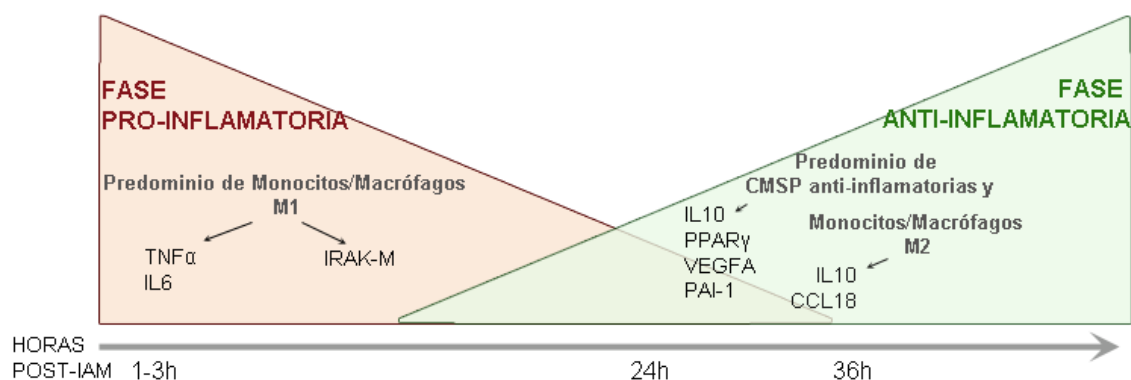


Figura D1. Esquema de las fases inflamatorias a nivel sistémico después del IAM en base a los resultados obtenidos en el estudio previo de nuestro laboratorio <sup>69</sup> como en el presente trabajo.

grupo SCASEST, aumentando el tamaño de la muestra, para poder estudiar si en el caso de estos pacientes al haber sufrido un IAM igual que los pacientes de SCACEST, también se observaba una reprogramación alternativa de sus M $\phi$ . Esta hipótesis se confirmó ya que los M $\phi$  de los pacientes de IAM, tanto los de SCASEST como los de SCACEST, presentaban un fenotipo anti-inflamatorio varias horas después del daño isquémico (Figura R8), tal y como apuntaban los resultados del microarray. Se observó una menor expresión de las citoquinas pro-inflamatorias TNF $\alpha$ , IL6 y MIF, a la vez que se producía un claro aumento de la proteína anti-inflamatoria IL10, así como de la quimioquina CCL2. Se observó claramente que los pacientes que tenían más lesiones coronarias, una mayor estenosis y además habían sufrido un IAM presentaban un fenotipo M2.

Este fenotipo M2 sugiere que en estos pacientes la respuesta a un estímulo pro-inflamatorio como el LPS estaría atenuada. Dependiendo del potencial de activación de los M $\phi$ , la estimulación con LPS puede inducir una respuesta pro-inflamatoria clásica M1, o bien una respuesta M2 o de tolerancia a endotoxinas.<sup>116, 250</sup> Así, en consonancia con el fenotipo M2 basal, se comprobó que los M $\phi$  de los pacientes de IAM presentaban tolerancia a endotoxinas (Figura R9). Es interesante destacar que la magnitud de la tolerancia era mayor en SCACEST que en SCASEST, ya que no sólo disminuía la producción de citoquinas pro-inflamatorias, sino que además presentan un aumento en la producción de proteínas anti-inflamatorias como IL10 o CCL18 (Figura R9). Además, este grupo de pacientes presenta gran homogeneidad en el perfil inflamatorio, ya que al clasificar los M $\phi$  utilizando el índice de activación basado en dos de los marcadores de M1 y M2 más estudiados, TNF $\alpha$  e IL10 respectivamente, comprobamos que todos los pacientes de SCACEST presentaban un fenotipo M2 (Figura R10). Por el contrario, en los pacientes de SCASEST se observaba más heterogeneidad en la respuesta, algo que ya se detectó en los análisis de agrupación en base a la expresión de las CMSP (Figura R1). Por otra parte, la mayoría de los pacientes de AI presentan una respuesta normal de los M $\phi$  o incluso una respuesta M1 más acentuada que los VS (Figura R10). Esta respuesta pro-inflamatoria sistémica en los pacientes de AI es un concepto que en estudios recientes se ha

denominado “paciente vulnerable”.<sup>220</sup> Un concepto que se apoya en evidencias que sugieren que los síndromes coronarios inestables están asociados a una activación inflamatoria generalizada del árbol coronario<sup>39, 248</sup> con un descenso en los niveles en plasma de IL10.<sup>283</sup>

Hay que mencionar que el contexto del SCA sugiere que la quimioquina CCL2 se englobaría dentro de una respuesta alternativa o M2, igual que sucede en la respuesta alternativa M2c de los TAMs.<sup>192</sup> Aunque esta quimioquina se ha asociado tanto a respuestas inflamatorias como anti-inflamatorias,<sup>190, 250</sup> se ha demostrado que existe un aumento de la expresión de CCL2 después de un IM,<sup>142</sup> lo que concuerda con los resultados obtenidos. Este aumento de CCL2 se ha correlacionado con una mayor reparación de la zona infartada<sup>73</sup> y su ausencia resulta en una prolongación de la fase pro-inflamatoria después del IM.<sup>329</sup> Estos estudios señalan el papel de la CCL2 en la resolución de la inflamación y en la fase reparadora, funciones asociadas al fenotipo M2 en los Mφ. Por tanto, estas funciones explicarían el aumento de CCL2, junto a las proteínas anti-inflamatorias IL10 y CCL18, en los Mφ de los pacientes de SCACEST (Figura R8-9).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la polarización M2 de los Mφ de sangre periférica es más frecuente en SCACEST que en SCASEST. Dado que los pacientes de ambos grupos han sufrido un IAM pero en los pacientes de SCACEST el número de las lesiones y la necrosis miocárdica son mayores (Tabla R2), parece existir una correlación entre el grado de daño en los tejidos y la polarización hacia M2 y la tolerancia a endotoxinas. Esta tolerancia que observamos en los pacientes de IAM ha sido ampliamente estudiada en otras patologías, como la sepsis o la fibrosis quística.<sup>70, 83, 209</sup> Sin embargo, en la mayoría de los casos esta respuesta atenuada al LPS se ha asociado a un contacto previo con la endotoxina.<sup>67, 71, 325</sup> Por otro lado, se ha descrito que los ligandos endógenos o DAMPs en determinadas circunstancias inducen características similares a la tolerancia a endotoxinas, como la disminución de TNFα o la sobre-expresión de IL10.<sup>2, 160, 164</sup> Por tanto, en vista de que los DAMPs juegan un papel crucial en el desarrollo de la inflamación y en el estado refractario observado en las inflamaciones estériles,<sup>68, 160</sup> y dado que en nuestra cohorte de pacientes no había ninguna infección previa, la generación de la tolerancia a endotoxinas podría ser provocada por la acción de DAMPs liberados por el daño tisular asociado al IAM, a la ruptura de la placa aterosclerótica o por las lesiones vasculares.

En este contexto, en los resultados del análisis de expresión ya pudimos comprobar que la respuesta al peligro juega un papel temprano e importante en el post-IM. En los pacientes de SCACEST, en los que ha habido una muerte celular masiva a causa del IAM, aparecen sobre-expresados genes que indican la presencia de daño en los tejidos, como IL8 o VGFA (Tabla A3). Este aumento de expresión de IL8 puede estar mediado, entre otros factores, por la señalización de los péptidos N-formilados, DAMPs endógenos derivados de mitocondrias, a través de sus receptores FPR.<sup>56</sup> Aparecen además entre los procesos más afectados el daño en órganos o la vía de señalización

del HMGB1, un DAMP prototípico (Figuras R3 y R6). Para determinar los posibles DAMPs implicados en la activación del sistema inmune en los pacientes de SCACEST, decidimos analizar si existían niveles significativos en el plasma. En primer lugar analizamos la presencia de HA que, sin embargo, no parece ser la causa de la tolerización de los M $\phi$  de sangre periférica, ya que los niveles no eran diferentes a los de VS (Figura R11).

Por otro lado, estudios recientes sugieren que las mitocondrias también son una fuente endógena de DAMPs, como ADN rico en motivos CpG no metilados o los péptidos N-formilados.<sup>56, 118, 339</sup> Además, diversos estudios demuestran que hay aumento de ADNmt en el plasma en condiciones críticas asociadas al daño celular.<sup>51, 107, 339</sup> En este sentido, en nuestro estudio confirmamos que en los pacientes de SCACEST existía un aumento significativo de los niveles circulantes de ADNmt (Figura R12). Estos pacientes son precisamente los que tienen más daño tisular. Cabe destacar además que los niveles elevados de ADNmt en el suero correlacionaban con el fenotipo M2 de los M $\phi$  de sangre periférica observado en estos pacientes (Figura R13). Este dato nos llevó a pensar que el ADNmt, al activar la respuesta inflamatoria, podría al mismo tiempo inducir la reprogramación hacia un estado de tolerancia a endotoxinas. En este sentido, es interesante destacar que en las CMSP de los pacientes de SCACEST aparece sobre-expresado el gen PAI-1 (Tabla R3). La proteína PAI-1 se ha asociado a la regulación negativa de la respuesta de M $\phi$ <sup>44</sup> y aumenta en M $\phi$  expuestos a ADN CpG y ADN bacteriano.<sup>302</sup> Estos DAMPs señalizan a través de TLR9, igual que el ADNmt. Así, la sobre-expresión de PAI-1 podría estar indicando que el aumento del ADNmt en SCACEST está activando a las células del sistema inmune.

En condiciones normales los ácidos nucleicos propios no activan la respuesta inmune innata, ya que son degradados por las nucleasas del suero antes de ser reconocidos por los TLRs de los endolisosomas (TLR7 y el TLR9).<sup>23</sup> Pero es posible que estos mecanismos de protección sean modificados durante la inflamación y las enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, si los ácidos nucleicos forman complejos con proteínas endógenas, como el HMGB1, pueden hacerse resistentes a las nucleasas y llegar así a los TLRs endosomales.<sup>303</sup> En el caso de los pacientes de SCACEST encontramos niveles elevados de ADNmt en el plasma, por lo tanto, la inflamación sistémica que se produce después del IAM debe estar afectando al menos a los mecanismos de degradación de ácidos nucleicos. De este modo, los M $\phi$  de sangre periférica en estos pacientes han estado expuestos al ADNmt al menos 24h, asumiendo que la liberación de ADNmt proviene exclusivamente del daño provocado por el IAM, y aun más tiempo si se tiene en cuenta que en estos pacientes hay daño vascular e inestabilidad en la placa arteriosclerótica previa al proceso del IAM. Además de la ruptura de las mitocondrias por la necrosis, las mitocondrias también estarían dañadas por la reperfusión después del IAM, ya que causa una sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> intracelular<sup>313</sup> y la generación de especies reactivas de oxígeno,<sup>12</sup> condiciones que también predisponen a un daño mitocondrial.<sup>255</sup>

Al analizar si la activación de los M $\phi$  por la exposición al ADNmt podría desencadenar la reprogramación hacia el estado de tolerancia a endotoxinas, comprobamos que, efectivamente, se produce una disminución en la respuesta al LPS en M $\phi$  humanos *in vitro* (Figura R16). Aunque en nuestro modelo experimental la incubación con el ADNmt sólo induce una leve respuesta inflamatoria, con producción significativa de IL6 (Figura R14), comprobamos que la exposición prolongada al ADNmt es capaz de generar una tolerancia similar a la tolerancia generada por el LPS. Estos resultados reflejan la situación que observamos en los pacientes de SCACEST, en los que se detectaron elevados niveles de ADNmt circulante y tolerancia a endotoxinas en los M $\phi$  de sangre periférica (Figura R9).

Hay que destacar que la incubación con ADNnu también genera tolerancia a endotoxinas, aunque más atenuada que en el caso del ADNmt (Figura R16-18). El hecho de que no se produzca una reprogramación tan acusada en este caso, ya que no se afecta la expresión de moléculas presentadoras de antígeno o el TNF $\alpha$ , puede ser debido a que el ADNnu no genera una inflamación significativa. En el caso de la incubación con ADNnu no se observaron cambios significativos en la producción de IL6 o TNF $\alpha$ , y sin embargo, la incubación con ADNmt induce un aumento de la producción de IL6 (Figura R14). En este sentido, en un estudio en células presentadoras de antígenos observaron que ADN de doble cadena murino no era capaz de inducir la producción de citoquinas, mientras que ADN CpG bacteriano (similar al ADNmt) sí, por lo que la respuesta inducida por el ADN genómico es distinta a la inducida por los motivos CpG.<sup>133</sup> Por un lado, estas diferencias pueden deberse a que activan vías diferentes. Se ha descrito que existen sensores citoplasmáticos de ADN de doble cadena, como DAI o AIM2.<sup>40, 298</sup> Por otro lado, aunque el TLR9 reconoce principalmente secuencias de ADN CpG no metiladas, también puede reconocer el ADN nuclear propio.<sup>167, 332</sup> En este caso, los diferentes efectos de cada uno de los ácidos nucleicos que observamos en nuestro trabajo pueden ser debidas a que, según diferentes estudios, la tolerancia cruzada se desarrolla de forma diferente según el compuesto que activa al TLR.<sup>76, 271, 272</sup> En cualquier caso, la reprogramación en la respuesta a la endotoxina era mayor en los pre-tratamientos con los extractos enriquecidos en ADNmt, lo que indica que es este ácido nucleico el que tiene mayores efectos.

Por otro lado, la presencia de ADNmt circulante en el suero de los pacientes de SCACEST es señal de que ha habido una ruptura de la mitocondria y, como consecuencia, otros DAMPs mitocondriales habrán sido liberados a la circulación. Curiosamente, la vía de señalización del HMGB1, que aparecía alterada en las CMSP de los pacientes de SCACEST, también se activa por el DAMP mitocondrial TFAM (factor transcripcional mitocondrial A),<sup>243, 303</sup> homólogo estructural y funcional de HMGB1<sup>241</sup> y un potente mediador pro-inflamatorio.<sup>56</sup> El efecto combinado de los distintos DAMPs mitocondriales al activar diferentes cascadas de señalización produciría una activación mayor y podría, por tanto, inducir una reprogramación más efectiva hacia una tolerancia

a endotoxinas. En concordancia, observamos que el efecto de los lisados mitocondriales en la reprogramación de los M $\phi$  era mucho mayor que el efecto del ADNmt solo. Con la exposición prolongada al lisado mitocondrial se produce un aumento significativo en la proporción de células CD163+ (Figura R20). Cabe mencionar que en nuestro modelo experimental la incubación con el lisado mitocondrial completo induce leve respuesta inflamatoria que es significativa solamente para la IL8 (Figura R19). Esto concuerda con los datos de estudios previos en los que comprueban que la IL6 o el TNF $\alpha$  se inducen a concentraciones mayores de lisado mitocondrial que las necesarias para inducir la producción de IL8.<sup>56</sup>

La reprogramación hacia el fenotipo M2 inducida por la exposición a los lisados mitocondriales concuerda con la marcada disminución, tanto en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como en la expresión de moléculas de presentación antigénica en respuesta al LPS (Figuras R21 y R23). Además, después del estímulo con la endotoxina, en los M $\phi$  pre-expuestos a los DAMPs mitocondriales observamos un aumento significativo de TGF- $\beta$ , así como del regulador negativo IRAK-M (Figura R21 F, G), uno de los mecanismos que limitan la respuesta pro-inflamatoria.<sup>176, 180</sup> Por tanto, de estos resultados podemos concluir que los DAMPs mitocondriales son capaces de generar tolerancia cruzada al TLR4. En diferentes estudios se ha sugerido que moléculas comunes en las vías de los TLRs, como MyD88, IRAK o TRAF6, están reprimidas en las células pre-condicionadas y esta inhibición de mecanismos comunes es lo que generaría la tolerancia a endotoxinas.<sup>169, 222, 271</sup> Estos mecanismos explicarían por qué se genera tolerancia a endotoxinas en M $\phi$  expuestos al lisado mitocondrial o al ADNmt ya que, por ejemplo, el ADNmt señala a través del TLR9<sup>339</sup> y se ha descrito que la activación de este TLR utilizando ADN CpG sintético genera tolerancia cruzada al TLR4.<sup>63</sup>

Por otra parte, cabría esperar que también se produjera tolerancia cruzada a la estimulación posterior con otros ligandos de los TLRs, a parte del TLR4, que compartan moléculas comunes de la vía de señalización. Según los resultados que obtuvimos al estimular con el PGN, sí se afecta la señalización de TLR2, aunque tan sólo se ve disminuida la producción de algunas citoquinas pro-inflamatorias, como TNF $\alpha$  o IL12 (Figura R24). El efecto sobre la activación de TLR2 no es tan amplio como sucede con la tolerancia cruzada al TLR4, ya que no se ven afectados ni la frecuencia del marcador CD163, ni las moléculas presentadoras de antígeno HLA-DQ y HLA-DR, como sí sucede cuando el segundo estímulo es el LPS (Figuras R22 y R23). El TLR2, el TLR4 y el TLR9 tienen múltiples moléculas de señalización comunes, como MyD88, IRAK o las quinasas inductoras de NF- $\kappa$ B,<sup>200, 331</sup> por lo que no sorprende que los DAMPs mitocondriales alteren la respuesta a un estímulo posterior del TLR4 o del TLR2. Sin embargo, el efecto sobre el TLR2 no es tan acusado como el observado sobre TLR4. Esto podría ser debido a que, en este caso, el espectro de componentes de señalización afectados sea menor que para la vía del TLR4.

Por otro lado, el TLR3 es el único TLR que no señala a través de MyD88, sino que es dependiente de la vía de TRIF.<sup>8</sup> Este dato es interesante, ya que en los parámetros analizados en este estudio no observamos ninguna alteración de la señalización a través de TLR3 con la pre-exposición a los DAMPs mitocondriales (Figura R27-29). Así, nuestros resultados sugieren que la reprogramación que ejercen los DAMPs mitocondriales podría estar afectando solamente a las vías dependientes de MyD88, elemento común en TLR4 y TLR2, pero no en TLR3. Este fenómeno ya se ha descrito en la tolerancia cruzada generada por MALP-2, un lipopéptido de *Mycoplasma fermentans* que señala a través de TLR2/TLR6, y que solo genera tolerancia al LPS para la vía dependiente de MyD88 pero no para la vía independiente.<sup>272</sup> En cualquier caso, la tolerancia cruzada que sí está descrita entre otros TLRs, no afecta de igual forma al TLR3. En un estudio en macrófagos alveolares de fumadores se describe la tolerancia cruzada inducida por el tabaco para la estimulación del TLR2 y el TLR4, pero no así para la estimulación del TLR3 con Poly I:C.<sup>61</sup> En este sentido, los micro-ARNs, en particular el miR-146A, están implicados en la tolerancia a endotoxinas.<sup>221</sup> Se ha descrito que el miR-146A aumenta tras la estimulación de TLR4, -2 y -5, pero no de TLR3, y produce la disminución de la actividad de las moléculas adaptadoras IRAK-1 y TRAF6, produciéndose una tolerización para todos los TLRs, excepto para TLR3.<sup>222</sup> Sería interesante estudiar si el miR-146A también juega un papel en la tolerancia cruzada que generan los DAMPs mitocondriales, en particular el ADNmt, ya que parece posible que al señalar por TLR9 induzca un aumento de este micro-ARN. Y en un contexto más amplio, en futuros estudios sería interesante comprobar cuáles son los componentes afectados de las vías de señalización, para determinar los que son comunes e independientes para cada TLR.

Pero además de las vías dependientes de los TLRs, en la generación de la tolerancia por los DAMPs mitocondriales deben estar implicadas más vías de señalización. Como se ha mencionado anteriormente, existen además del ADNmt, multitud de DAMPs en el conjunto del lisado mitocondrial que se utilizó para las pre-exposiciones. Por tanto, pueden estar activando otros PRRs como los NOD o los FPR. Así, los ya mencionados péptidos N-formilados que señalan a través de receptores FPR,<sup>126, 254, 257</sup> o la proteína TFAM, reconocida por varios TLRs<sup>243</sup> y por RAGE<sup>303</sup>, pueden estar implicados en la reprogramación de los Mφ que observamos en nuestro estudio. En este sentido, existen algunos ejemplos en los que otros receptores modifican la señalización a través de los TLRs. Por ejemplo, el efecto ateroprotector de la esfingosina-1 fosfato (S1P) ocurre por la atenuación del TLR2 por los receptores de S1P de clase 1 y clase 2,<sup>77</sup> y los receptores X del hígado (LXRs) modulan negativamente las vías de señalización de los TLRs.<sup>89, 288</sup>

Teniendo en cuenta el conjunto de resultados obtenidos, podemos concluir que la tolerancia generada por la exposición a los DAMPs mitocondriales está controlada por mecanismos de regulación que son diferentes para cada citoquina, aunque pertenezcan al mismo grupo funcional. Mientras que la pre-exposición a los DAMPs mitocondriales induce una disminución de la

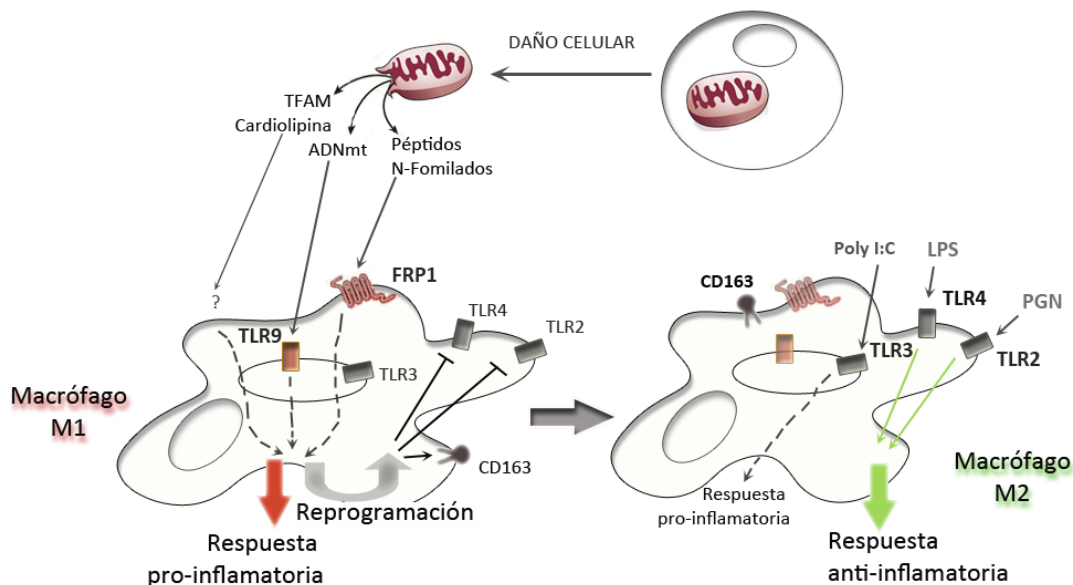


producción de TNF $\alpha$  e IL12p70 en respuesta al LPS y al PGN, la producción de la IL6 o la IL1 $\beta$  no se reduce en respuesta al PGN (Figuras R21 y R24). Este comportamiento diferencial es lógico ya que la estimulación con LPS y PGN induce multitud de productos con diferentes funciones que tendrán, por tanto, diferentes requerimientos en su regulación.<sup>93</sup> Por ello, no resulta factible que todos los genes inducidos por los TLRs se controlen exclusivamente a nivel de señalización, ya que este mecanismo no puede discriminar entre los distintos grupos de genes con diferentes funciones. En este sentido, se ha demostrado que la producción de TNF $\alpha$  en células con tolerancia a endotoxinas está controlada a nivel transcripcional. El silenciamiento de TNF $\alpha$  es el resultado de la remodelación de la cromatina por metilación de histonas en el promotor, lo que disminuye la unión de NF- $\kappa$ B y por tanto la transcripción.<sup>80</sup> Esta regulación a nivel transcripcional por modificaciones en la cromatina se ha descrito también para la IL1 $\beta$ .<sup>57, 336</sup> Por otro lado, la expresión de IL12p40 también está regulada a nivel transcripcional, en este caso inhibida por los dímeros de activación tardía p52/RelB.<sup>267</sup> La existencia de estos mecanismos de regulación específicos explica las diferencias que se observan en nuestro trabajo en cuanto a los efectos sobre la producción de las distintas citoquinas de la exposición a los lisados mitocondriales.

En conjunto, podemos afirmar que los DAMPs derivados de las mitocondrias juegan un papel importante como moduladores de la inflamación en los M $\phi$ . Sin embargo, los M $\phi$  también están involucrados en el inicio y la regulación de las respuestas adaptativas. Son capaces de influenciar la producción de citoquinas asociadas a las diferentes respuestas de los linfocitos T. En nuestro estudio comprobamos que había producción de IL17 y de IFN $\gamma$  tanto en los co-cultivos de linfocitos T CD4+ con M $\phi$  con perfil M2 (es decir, M $\phi$  pre-expuestos a DAMPs mitocondriales y luego estimulados con LPS), como en los co-cultivos con M $\phi$  con perfil M1 (M $\phi$  con un solo estímulo de LPS). Sin embargo, sólo en los co-cultivos con M $\phi$  con perfil M2 se daba un aumento en la producción de IL4 (Figura R30). La IL4 es una citoquina asociada a la respuesta Th2 en linfocitos T CD4+, por tanto sugiere que los M $\phi$  polarizados hacia una respuesta M2 por los DAMPs mitocondriales promueven una respuesta mixta pero podrían estar induciendo un cambio hacia una respuesta Th2. Estos resultados, junto con los datos obtenidos del plasma de pacientes de SCACEST, en los que se observaron menores niveles de citoquinas pro-inflamatorias (Figura R31 C), y los datos del análisis del perfil de expresión génica de estos pacientes, que indicaban una respuesta negativa de linfocitos T (Figura R7), sugieren que en los pacientes de SCACEST no sólo está afectada la respuesta de los M $\phi$ , sino también probablemente la respuesta adaptativa.

En conclusión, los resultados *in vitro* indican que los DAMPs mitocondriales serían reconocidos por receptores de los M $\phi$  iniciando una respuesta inflamatoria similar a la respuesta generada por las bacterias. A pesar de tantos años de coexistencia simbiótica con la mitocondria, aun seguimos reaccionando a su origen procariota. En este caso, la evolución ha seleccionado en contra una





**Figura D2. Representación de los efectos de los DAMPs mitocondriales sobre la respuesta de Mφ.**

tolerancia hacia los antígenos mitocondriales ya que de otro modo nos habría hecho vulnerables a infecciones bacterianas. El reconocimiento de estos DAMPs por receptores que alternativamente también reconocen bacterias, como el TLR9 o el FPR1, explicaría por qué las repuestas a los DAMPs mitocondriales se parecen a la sepsis<sup>51,339</sup> y apoya la observación de que en condiciones estériles los Mφ desarrollen tolerancia a endotoxinas.<sup>170</sup> Así, al mismo tiempo que activan vías pro-inflamatorias se inicia la reprogramación a M2 que conduce a una respuesta atenuada frente a estímulos pro-inflamatorios bacterianos como el LPS o el PGN (Figura D2).

Aunque es importante mantener la respuesta inflamatoria bajo control para que no se produzcan daños en el organismo, como sucede en el choque séptico o en el SRIS,<sup>29</sup> esta tolerización ha de mantenerse bajo un estrecho control ya que genera una susceptibilidad a sufrir más infecciones.<sup>29, 48</sup> Por tanto, a pesar de que los Mφ con un perfil M2 promueven la reparación de tejidos e impiden que la respuesta inmune ocasione un daño adicional, también limitan la respuesta a un episodio infeccioso posterior. Así, de acuerdo con el estado tolerante de sus Mφ de sangre periférica, más del 21% de los pacientes de IAM que presentaban un fenotipo M2 sufrieron una infección en los 3 meses posteriores al episodio coronario (Figura R31 A, B). Los Mφ de los pacientes con infección subsiguiente, analizados 24-36h después del IM, no fueron capaces de aumentar la expresión de TNFα después del estímulo con LPS y, sin embargo, mostraban un aumento significativo de los niveles de ARNm de IL10. Cabe destacar que en los estudios *in vitro* de tolerización con los DAMPs mitocondriales se generaba tolerancia cruzada al TLR4 y parcialmente al TLR2, pero no así para el TLR3 que mediaría el reconocimiento de ARN viral.<sup>10</sup> Cabría esperar que en pacientes con elevados niveles de DAMPs mitocondriales en circulación pueda existir una mayor afectación de la respuesta frente bacterias Gram positivas y Gram negativas y que, sin embargo, la respuesta a virus

no se viera afectada. En este sentido, las infecciones detectadas en los pacientes de SCA estaban causadas tanto por bacterias Gram negativas como positivas, pero no se detectaron infecciones víricas. Sin embargo, debido a que la muestra de pacientes con infecciones posteriores no es lo suficientemente grande, no se pueden extraer conclusiones significativas estadísticamente.

En conjunto, podemos concluir que la inflamación inicial producida por el daño isquémico activa al sistema inmune innato, iniciando además una reprogramación de modo que después se da un cambio hacia una respuesta anti-inflamatoria. Aunque esta reprogramación es beneficiosa para evitar el aumento del daño en los tejidos, comprobamos que predispone a estos pacientes a sufrir infecciones secundarias. Por tanto, clasificar el estado inflamatorio de los M $\phi$  de sangre periférica podría ser un factor pronóstico útil del resultado que tendrá el daño cardíaco, ya que son esenciales para la resolución de la inflamación y la transición a la fase reparativa. En este sentido, este tipo de estudios son de gran relevancia para la identificación de potenciales dianas que permitan reprogramar el fenotipo de los M $\phi$  y dirigir su actividad en procesos regenerativos tras el daño isquémico del corazón. Además, teniendo en cuenta el perfil inflamatorio se podrían prevenir posibles infecciones nosocomiales. Por tanto, este trabajo amplía los conocimientos de las implicaciones de la inflamación después del IAM y sus efectos en la respuesta inmune innata, sus causas potenciales y la importancia clínica respecto a las infecciones posteriores. En este mismo sentido, dado su papel en los procesos inflamatorios, los niveles de antígenos mitocondriales en el plasma como por ejemplo el ADNmt o el citocromo c, podrían ser de utilidad como marcadores del riesgo de susceptibilidad a enfermedades nosocomiales en el SCA y en otras patologías en las que se lesionen tejidos, como en el trauma.

La clasificación efectiva de los pacientes de SCA es uno de los principales aspectos estudiados en medicina de urgencias. Algunas líneas de investigación se han centrado en el proceso inflamatorio como factor pronóstico,<sup>90</sup> ya que se ha demostrado que elevados niveles en plasma de marcadores inflamatorios están asociados al aumento del riesgo de eventos cardíacos adversos graves en pacientes de SCA.<sup>177,178</sup> El presente trabajo pone de manifiesto que no sólo los marcadores bioquímicos ayudan en la prognosis de SCA. La respuesta global del sistema inmune, analizada en este trabajo mediante arrays de expresión y análisis *in silico* es capaz de establecer que hay un cambio en el perfil transcripcional en los pacientes con IAM (SCACEST) frente a pacientes que no habían sufrido un IAM (pacientes de AI). Estos resultados sugieren que el uso combinado de microarrays de expresión y de los análisis funcionales puede ayudar a definir las bases de la iniciación, desarrollo y progreso de los SCA. En estudios futuros sería necesario analizar en profundidad los genes descritos en este trabajo, con el fin de descubrir su potencial en la mejora de la prevención y el tratamiento de los pacientes que han sufrido un IAM. Por otro lado, los M $\phi$  están emergiendo como una herramienta terapéutica en diversas enfermedades, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares o

trastornos autoinmunes. En este estudio se evaluó el estado de activación de los M $\phi$  en la sangre y su correlación con las tasas de infección posteriores. Pero también sería interesante determinar cómo la respuesta de los M $\phi$  en sangre está relacionada con las respuestas en el tejido.

Finalmente, el descubrimiento de la existencia de ligandos endógenos de los receptores del sistema inmune proporciona una nueva visión de la patogénesis del SCA. A este respecto, en nuestro estudio hallamos un aumento significativo de ADNmt en pacientes de SCACEST, en los cuales existe una reprogramación del sistema inmune innato. Además, y a pesar de que la complejidad del contexto clínico no se puede simular completamente en los modelos experimentales, pudimos comprobar que estos DAMPs mitocondriales son capaces de reprogramar la respuesta de los M $\phi$  *in vitro*. Conocer qué moléculas activan al sistema inmune y sus mecanismos de acción puede ser muy útil para modular sus efectos, lo que constituiría una herramienta terapéutica beneficiosa no sólo en las enfermedades de las arterias coronarias, sino a otras condiciones clínicas en las que se produzca un daño en los tejidos como en SRIS,<sup>1</sup> artritis reumatoide,<sup>51</sup> daño hepático,<sup>204</sup> trauma,<sup>126, 166, 339</sup> daño pulmonar<sup>277</sup> o en tratamientos de quimioterapia.<sup>292</sup>

## **6. CONCLUSIONES**



1. El perfil de expresión génica en las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes de SCACEST indica el predominio de una regulación negativa de la respuesta de linfocitos, macrófagos y neutrófilos 24-36h después del IAM.
2. Los monocitos/macrófagos de sangre periférica de los pacientes de SCASEST y SCACEST presentan un fenotipo M2 24-36h después del IAM, que se correlaciona con una tolerancia a endotoxinas en respuesta a la estimulación con LPS *ex vivo*.
3. Los niveles de ADNmt en el suero de los pacientes de SCACEST son mayores que en el resto de pacientes de SCA y que en voluntarios sanos.
4. Los niveles de ADNmt correlacionan con el fenotipo M2 y con el estado de tolerancia a endotoxinas observado en los pacientes con IAM.
5. Tanto el ADNmt, como el conjunto de DAMPs mitocondriales presentes en los lisados de mitocondrias, provocan una leve respuesta inflamatoria y, al mismo tiempo, inducen la reprogramación de la respuesta de los monocitos/macrófagos hacia un fenotipo de tolerancia a endotoxinas *in vitro*.
6. Los DAMPs mitocondriales, además de generar tolerancia cruzada al TLR4, son capaces de generar tolerancia cruzada parcial al TLR2 en monocitos/macrófagos, pero no al TLR3.
7. Los pacientes de IAM, SCASEST y SCACEST, presentan una mayor frecuencia de infecciones bacterianas posteriores, lo que correlaciona con el estado de tolerancia a endotoxinas observado en sus monocitos/macrófagos de sangre periférica.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**





1. Adachi N, Hirota M, Hamaguchi M, Okamoto K, Watanabe K, Endo F (2004). Serum cytochrome c level as a prognostic indicator in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Clin Chim Acta*. 342:127-136
2. Adair-Kirk TL, Senior RM (2008). Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 40:1101-1110
3. Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, Asehnoune K, Fitting C, Pinsky MR, Dhainaut JF, Cavaillon JM (2000). Nf-kappab expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med*. 162:1877-1883
4. Adib-Conquy M, Cavaillon JM (2009). Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost*. 101:36-47
5. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL (2003). Interleukin-23 promotes a distinct cd4 t cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*. 278:1910-1914
6. Ahlemeyer B, Klumpp S, Kriegstein J (2002). Release of cytochrome c into the extracellular space contributes to neuronal apoptosis induced by staurosporine. *Brain Res*. 934:107-116
7. Akira S, Takeda K (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 4:499-511
8. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124:783-801
9. Albert NM (2000). Inflammation and infection in acute coronary syndrome. *J Cardiovasc Nurs*. 15:13-26
10. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001). Recognition of double-stranded rna and activation of nf-kappab by toll-like receptor 3. *Nature*. 413:732-738
11. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP (2000). Myocardial infarction redefined-a consensus document of the joint european society of cardiology/american college of cardiology committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 36:959-969
12. Ambrosio G, Zweier JL, Duilio C, Kuppusamy P, Santoro G, Elia PP, Tritto I, Cirillo P, Condorelli M, Chiariello M, et al. (1993). Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem*. 268:18532-18541
13. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, Jr., Chavey WE, 2nd, Fesmire FM, Hochman JS, Levin TN, Lincoff AM, Peterson ED, Theroux P, Wenger NK, Wright RS, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Halperin JL, Hunt SA, Krumholz HM, Kushner FG, Lytle BW, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B (2007). Acc/aha 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-st-elevation myocardial infarction: A report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines (writing committee to revise the 2002 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-st-elevation myocardial infarction) developed in collaboration with the american college of emergency physicians, the society for cardiovascular angiography and interventions, and the society of thoracic surgeons endorsed by the american association of cardiovascular and pulmonary rehabilitation and the society for academic emergency medicine. *J Am Coll Cardiol*. 50:e1-e157

14. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al. (1995). Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 26:1235-1241
15. Andreu AL, Martínez R, Martí R, García-Arumi E (2009). Quantification of mitochondrial DNA copy number: Pre-analytical factors. *Mitochondrion.* 9:242-246
16. Apple FS, Jesse RL, Newby LK, Wu AH, Christenson RH (2007). National academy of clinical biochemistry and ifcc committee for standardization of markers of cardiac damage laboratory medicine practice guidelines: Analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Circulation.* 115:e352-355
17. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G (1998). Molecular mechanisms of the induction of il-12 and its inhibition by il-10. *The Journal of Immunology.* 160:5936-5944
18. Aziz-Seible RS, Casey CA (2011). Fibronectin: Functional character and role in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 17:2482-2499
19. Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ (1992). Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation.* 86:III74-85
20. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD (2008). MicroRNAs: New regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol.* 9:839-845
21. Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E (1994). Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: Implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 28:1176-1179
22. Barber GN (2011). Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunol Rev.* 243:99-108
23. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R (2006). Intracellular localization of toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol.* 7:49-56
24. Beeson PB (1946). Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockade. *Proc Soc Exp Biol Med.* 61:248-250
25. Behrendt D, Ganz P (2002). Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* 90:40L-48L
26. Berger FM (1967). The effect of endotoxin on resistance to infection and disease. *Adv Pharmacol.* 5:19-46
27. Biswas SK, Bist P, Dhillon MK, Kajiji T, Del Fresno C, Yamamoto M, Lopez-Collazo E, Akira S, Tergaonkar V (2007). Role for myd88-independent, trif pathway in lipid a/tlr4-induced endotoxin tolerance. *J Immunol.* 179:4083-4092
28. Biswas SK, Sica A, Lewis CE (2008). Plasticity of macrophage function during tumor progression: Regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol.* 180:2011-2017
29. Biswas SK, Lopez-Collazo E (2009). Endotoxin tolerance: New mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 30:475-487
30. Biswas SK, Mantovani A (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 11:889-896
31. Blackwell T, Blackwell T, Christman J (1997). Induction of endotoxin tolerance depletes nuclear factor-kappaB and suppresses its activation in rat alveolar macrophages. *Journal of Leukocyte Biology.* 62:885-891

32. Blumenthal A, Ehlers S, Lauber J, Buer J, Lange C, Goldmann T, Heine H, Brandt E, Reiling N (2006). The wingless homolog *wnt5a* and its receptor *frizzled-5* regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood*. 108:965-973
33. Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GC, Erlich JH, Gerondakis S, Mackman N, Ulevitch RJ (1998). Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of *nf-kappab*. *J Clin Invest*. 102:1645-1652
34. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A (2003). Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23:168-175
35. Bouhlel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G (2007). Ppargamma activation primes human monocytes into alternative m2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*. 6:137-143
36. Brenneis C, Coste O, Altenrath K, Angioni C, Schmidt H, Schuh CD, Zhang DD, Henke M, Weigert A, Brune B, Rubin B, Nusing R, Scholich K, Geisslinger G (2011). Anti-inflammatory role of microsomal prostaglandin e synthase-1 in a model of neuroinflammation. *J Biol Chem*. 286:2331-2342
37. Buckley JM, Wang JH, Redmond HP (2006). Cellular reprogramming by gram-positive bacterial components: A review. *J Leukoc Biol*. 80:731-741
38. Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G (2000). Regulation of scavenger receptor cd163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol*. 67:97-103
39. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A (2002). Widespread coronary inflammation in unstable angina. *New England Journal of Medicine*. 347:5-12
40. Burckstummer T, Baumann C, Bluml S, Dixit E, Durnberger G, Jahn H, Planyavsky M, Bilban M, Colinge J, Bennett KL, Superti-Furga G (2009). An orthogonal proteomic-genomic screen identifies aim2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol*. 10:266-272
41. Caggiano AO, Kraig RP (1998). Prostaglandin e2 and 4-aminopyridine prevent the lipopolysaccharide-induced outwardly rectifying potassium current and interleukin-1beta production in cultured rat microglia. *J Neurochem*. 70:2357-2368
42. Calvano JE, Bowers DJ, Coyle SM, Macor M, Reddell MT, Kumar A, Calvano SE, Lowry SF (2006). Response to systemic endotoxemia among humans bearing polymorphisms of the toll-like receptor 4 (*htlr4*). *Clin Immunol*. 121:186-190
43. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK, Miller-Graziano C, Moldawer LL, Mindrinos MN, Davis RW, Tompkins RG, Lowry SF (2005). A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*. 437:1032-1037
44. Cao C, Lawrence DA, Li Y, Von Arnim CAF, Herz J, Su EJ, Makarova A, Hyman BT, Strickland DK, Zhang L (2006). Endocytic receptor *Irp* together with *tpa* and *pai-1* coordinates mac-1-dependent macrophage migration. *EMBO J*. 25:1860-1870
45. Cardon LR, Burge C, Clayton DA, Karlin S (1994). Pervasive cpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:3799-3803

46. Carmeliet P (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 9:653-660
47. Cavaillon JM (1995). The nonspecific nature of endotoxin tolerance. *Trends Microbiol.* 3:320-324
48. Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M (2003). Endotoxin tolerance: Is there a clinical relevance? *J Endotoxin Res.* 9:101-107
49. Cavaillon JM, Adib-Conquy M (2006). Bench-to-bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care.* 10:233
50. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N (2000). Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: A consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 35:569-582
51. Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson IM, Tarkowski A (2004). Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol.* 75:995-1000
52. Conference ACoPSoCCMC (1992). American college of chest physicians/society of critical care medicine consensus conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 20:864-874
53. Coraux C, Martinella-Catusse C, Nawrocki-Raby B, Hajj R, Burlet H, Escotte S, Laplace V, Birembaut P, Puchelle E (2005). Differential expression of matrix metalloproteinases and interleukin-8 during regeneration of human airway epithelium in vivo. *J Pathol.* 206:160-169
54. Cossarizza A, Pinti M, Nasi M, Gibellini L, Manzini S, Roat E, De Biasi S, Bertoncelli L, Montagna JP, Bisi L, Manzini L, Trenti T, Borghi V, Mussini C (2011). Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during hiv infection: A new role for mitochondrial damage-associated molecular patterns during inflammation. *Mitochondrion.* 11:750-755
55. Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Struck J, Cook CH (2006). Carbamoyl phosphate synthase-1: A marker of mitochondrial damage and depletion in the liver during sepsis. *Crit Care Med.* 34:2439-2446
56. Crouser ED, Shao G, Julian MW, Macre JE, Shadel GS, Tridandapani S, Huang Q, Wewers MD (2009). Monocyte activation by necrotic cells is promoted by mitochondrial proteins and formyl peptide receptors. *Crit Care Med.* 37:2000-2009
57. Chan C, Li L, McCall CE, Yoza BK (2005). Endotoxin tolerance disrupts chromatin remodeling and nf-kappab transactivation at the il-1beta promoter. *J Immunol.* 175:461-468
58. Chan G, Bivins-Smith ER, Smith MS, Smith PM, Yurochko AD (2008). Transcriptome analysis reveals human cytomegalovirus reprograms monocyte differentiation toward an m1 macrophage. *J Immunol.* 181:698-711
59. Chaudry IH, Ayala A (1993). Mechanism of increased susceptibility to infection following hemorrhage. *The American Journal of Surgery.* 165:59S-67S
60. Chazotte B (2011). Labeling mitochondria with mitotracker dyes. *Cold Spring Harbor Protocols.* 2011:pdb.prot5648
61. Chen H, Cowan MJ, Hasday JD, Vogel SN, Medvedev AE (2007). Tobacco smoking inhibits expression of proinflammatory cytokines and activation of il-1r-associated kinase, p38, and nf-kappab in alveolar macrophages stimulated with tlr2 and tlr4 agonists. *J Immunol.* 179:6097-6106

62. Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, Trinchieri G, Kim TS (2000). Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and nuclear factor- $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry*. 275:32681-32687
63. Dalpke AH, Lehner MD, Hartung T, Heeg K (2005). Differential effects of CpG-DNA in toll-like receptor-2/-4/-9 tolerance and cross-tolerance. *Immunology*. 116:203-212
64. de Lemos JA, Morrow DA (2002). Brain natriuretic peptide measurement in acute coronary syndromes: Ready for clinical application? *Circulation*. 106:2868-2870
65. De Mori R, Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, Pompilio G, Palumbo R, Bianchi ME, Capogrossi MC, Germani A (2007). Multiple effects of high mobility group box protein 1 in skeletal muscle regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27:2377-2383
66. Degousee N, Fazel S, Angoulvant D, Stefanski E, Pawelzik SC, Korotkova M, Arab S, Liu P, Lindsay TF, Zhuo S, Butany J, Li RK, Audoly L, Schmidt R, Angioni C, Geisslinger G, Jakobsson PJ, Rubin BB (2008). Microsomal prostaglandin e2 synthase-1 deletion leads to adverse left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation*. 117:1701-1710
67. del Campo R, Martínez E, del Fresno C, Alenda R, Gómez-Piña V, Fernández-Ruiz I, Siliceo M, Jurado T, Toledano V, Arnalich F, García-Río F, López-Collazo E (2011). Translocated Lps might cause endotoxin tolerance in circulating monocytes of cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 6:e29577
68. del Fresno C, Otero K, Gomez-Garcia L, Gonzalez-Leon MC, Soler-Ranger L, Fuentes-Prior P, Escoll P, Baos R, Caveda L, Garcia F, Arnalich F, Lopez-Collazo E (2005). Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating il-1 receptor associated kinase-m expression via cd44 and tlr4. *J Immunol*. 174:3032-3040
69. del Fresno C, Soler-Rangel L, Soares-Schanoski A, Gomez-Pina V, Gonzalez-Leon MC, Gomez-Garcia L, Mendoza-Barbera E, Rodriguez-Rojas A, Garcia F, Fuentes-Prior P, Arnalich F, Lopez-Collazo E (2007). Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate irak-m and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *J Endotoxin Res*. 13:39-52
70. del Fresno C, Gomez-Pina V, Lores V, Soares-Schanoski A, Fernandez-Ruiz I, Rojo B, Alvarez-Sala R, Caballero-Garrido E, Garcia F, Veliz T, Arnalich F, Fuentes-Prior P, Garcia-Rio F, Lopez-Collazo E (2008). Monocytes from cystic fibrosis patients are locked in an Lps tolerance state: Down-regulation of trem-1 as putative underlying mechanism. *PLoS One*. 3:e2667
71. del Fresno C, Garcia-Rio F, Gomez-Pina V, Soares-Schanoski A, Fernandez-Ruiz I, Jurado T, Kajiji T, Shu C, Marin E, Gutierrez del Arroyo A, Prados C, Arnalich F, Fuentes-Prior P, Biswas SK, Lopez-Collazo E (2009). Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: Demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol*. 182:6494-6507
72. Deng JC, Cheng G, Newstead MW, Zeng X, Kobayashi K, Flavell RA, Standiford TJ (2006). Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by irak-m. *J Clin Invest*. 116:2532-2542
73. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG (2005). Ccl2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*. 96:881-889

74. Dieudé M, Striegl H, Tyznik AJ, Wang J, Behar SM, Piccirillo CA, Levine JS, Zajonc DM, Rauch J (2011). Cardiolipin binds to cd1d and stimulates cd1d-restricted  $\gamma\delta$  t cells in the normal murine repertoire. *The Journal of Immunology*. 186:4771-4781
75. Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG (2010). Ccr5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory t cells. *Am J Pathol*. 176:2177-2187
76. Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, Cody MJ, Michalek SM, Rice NR, Vogel SN (2003). Induction of in vitro reprogramming by toll-like receptor (tlr)2 and tlr4 agonists in murine macrophages: Effects of tlr “homotolerance” versus “heterotolerance” on nf-kappa b signaling pathway components. *J Immunol*. 170:508-519
77. Duenas AI, Aceves M, Fernandez-Pisonero I, Gomez C, Orduna A, Crespo MS, Garcia-Rodriguez C (2008). Selective attenuation of toll-like receptor 2 signalling may explain the atheroprotective effect of sphingosine 1-phosphate. *Cardiovasc Res*. 79:537-544
78. Eby K, Rosenbluth J, Mays D, Marshall C, Barton C, Sinha S, Johnson K, Tang L, Pietsenpol J (2010). Isg20l1 is a p53 family target gene that modulates genotoxic stress-induced autophagy. *Molecular Cancer*. 9:95
79. Ehlers M, Ravetch JV (2007). Opposing effects of toll-like receptor stimulation induce autoimmunity or tolerance. *Trends Immunol*. 28:74-79
80. El Gazzar M, Liu T, Yoza BK, McCall CE (2010). Dynamic and selective nucleosome repositioning during endotoxin tolerance. *J Biol Chem*. 285:1259-1271
81. Elinav E, Strowig T, Henao-Mejia J, Flavell RA (2011). Regulation of the antimicrobial response by nlr proteins. *Immunity*. 34:665-679
82. Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Bröcker E-B, Gillitzer R (1998). Chemokines il-8, gro $\alpha$ , mcp-1, ip-10, and mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *The American Journal of Pathology*. 153:1849-1860
83. Escoll P, del Fresno C, Garcia L, Valles G, Lendinez MJ, Arnalich F, Lopez-Collazo E (2003). Rapid up-regulation of irak-m expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 311:465-472
84. Faber J, Meyer CU, Gemmer C, Russo A, Finn A, Murdoch C, Zenz W, Mannhalter C, Zabel BU, Schmitt HJ, Habermehl P, Zepp F, Knuf M (2006). Human toll-like receptor 4 mutations are associated with susceptibility to invasive meningococcal disease in infancy. *Pediatr Infect Dis J*. 25:80-81
85. Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK, Badimon L (1994). Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: Implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*. 23:1562-1569
86. Fernandez-Vizarra E, Lopez-Perez MJ, Enriquez JA (2002). Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods*. 26:292-297
87. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR (1978). The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest*. 73:843-849



88. Fitzgerald GA (2004). Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 351:1709-1711
89. Fontaine C, Rigamonti E, Pourcet B, Duez H, Duhem C, Fruchart JC, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B (2008). The nuclear receptor rev-erb $\alpha$  is a liver x receptor (l $\alpha$ r) target gene driving a negative feedback loop on select l $\alpha$ r-induced pathways in human macrophages. *Mol Endocrinol.* 22:1797-1811
90. Fosco MJ, Ceretti V, Agranatti D (2010). Systemic inflammatory response syndrome predicts mortality in acute coronary syndrome without congestive heart failure. *West J Emerg Med.* 11:373-378
91. Foster C, Singh M, Subramanian V, Singh K (2011). Ataxia telangiectasia mutated kinase plays a protective role in  $\beta$ -adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte apoptosis and myocardial remodeling. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 353:13-22
92. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R (2007). Gene-specific control of inflammation by tlr-induced chromatin modifications. *Nature.* 447:972-978
93. Foster SL, Medzhitov R (2009). Gene-specific control of the tlr-induced inflammatory response. *Clin Immunol.* 130:7-15
94. Fox KAA (2004). Management of acute coronary syndromes: An update. *Heart.* 90:698-706
95. Fraker DL, Stovroff MC, Merino MJ, Norton JA (1988). Tolerance to tumor necrosis factor in rats and the relationship to endotoxin tolerance and toxicity. *J Exp Med.* 168:95-105
96. Frangogiannis NG (2012). Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res.* 110:159-173
97. Frankenberger M, Pechumer H, Ziegler-Heitbrock HW (1995). Interleukin-10 is upregulated in lps tolerance. *J Inflamm.* 45:56-63
98. Freudenberg MA, Galanos C (1988). Induction of tolerance to lipopolysaccharide (lps)-d-galactosamine lethality by pretreatment with lps is mediated by macrophages. *Infect Immun.* 56:1352-1357
99. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H (2003). Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: Roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther.* 100:171-194
100. Fujiwara N, Kobayashi K (2005). Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 4:281-286
101. Fukao T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Matsuda S, Asano T, Kadowaki T, Takeuchi T, Koyasu S (2002). Pi3k-mediated negative feedback regulation of il-12 production in dcs. *Nat Immunol.* 3:875-881
102. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH (1992). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med.* 326:242-250
103. Galaup A, Gomez E, Souktani R, Durand M, Cazes A, Monnot C, Teillon J, Le Jan S, Bouleti C, Briois G, Philippe J, Pons S, Martin V, Assaly R, Bonnin P, Ratajczak P, Janin A, Thurston G, Valenzuela DM, Murphy AJ, Yancopoulos GD, Tissier R, Berdeaux A, Ghaleh B, Germain S (2012). Protection against myocardial infarction and no-reflow through preservation of vascular integrity by angiopoietin-like 4. *Circulation.* 125:140-149
104. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 94:2493-2503



105. Garcia Fernandez M, Troiano L, Moretti L, Nasi M, Pinti M, Salvioli S, Dobrucki J, Cossarizza A (2002). Early changes in intramitochondrial cardiolipin distribution during apoptosis. *Cell Growth Differ.* 13:449-455
106. Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P (2010). Immunogenic cell death, damp and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta.* 1805:53-71
107. Garrabou G, Moren C, Lopez S, Tobias E, Cardellach F, Miro O, Casademont J (2012). The effects of sepsis on mitochondria. *J Infect Dis.* 205:392-400
108. Gerrity RG (1981). The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 103:191-200
109. Ghajar CM, George SC, Putnam AJ (2008). Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 18:251-278
110. Ghosh MC, Collins GD, Vandanmagsar B, Patel K, Brill M, Carter A, Lustig A, Becker KG, Wood WW, 3rd, Emeche CD, French AD, O'Connell MP, Xu M, Weeraratna AT, Taub DD (2009). Activation of wnt5a signaling is required for cxc chemokine ligand 12-mediated t-cell migration. *Blood.* 114:1366-1373
111. Gimbrone MA, Jr. (1995). Vascular endothelium: An integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 75:67B-70B
112. Goerdt S, Orfanos CE (1999). Other functions, other genes: Alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity.* 10:137-142
113. Gomez-Pina V, Soares-Schanoski A, Rodriguez-Rojas A, Del Fresno C, Garcia F, Vallejo-Cremades MT, Fernandez-Ruiz I, Arnalich F, Fuentes-Prior P, Lopez-Collazo E (2007). Metalloproteinases shed trem-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol.* 179:4065-4073
114. Gondokaryono SP, Ushio H, Niyonsaba F, Hara M, Takenaka H, Jayawardana ST, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H (2007). The extra domain a of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol.* 82:657-665
115. Gordon S, Taylor PR (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5:953-964
116. Gordon S, Martinez FO (2010). Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity.* 32:593-604
117. Gosset P, Charbonnier A-S, Delerive P, Fontaine J, Staels B, Pestel J, Tonnel A-B, Trottein F (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *European Journal of Immunology.* 31:2857-2865
118. Gray MW, Burger G, Lang BF (1999). Mitochondrial evolution. *Science.* 283:1476-1481
119. Gribar SC, Sodhi CP, Richardson WM, Anand RJ, Gittes GK, Branca MF, Jakub A, Shi XH, Shah S, Ozolek JA, Hackam DJ (2009). Reciprocal expression and signaling of tlr4 and tlr9 in the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis. *J Immunol.* 182:636-646
120. Hammerman H, Kloner RA, Hale S, Schoen FJ, Braunwald E (1983). Dose-dependent effects of short-term methylprednisolone on myocardial infarct extent, scar formation, and ventricular function. *Circulation.* 68:446-452
121. Hansson GK (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 352:1685-1695

122. Harada K, Nakanuma Y (2007). Biliary innate immunity and cholangiopathy. *Hepatol Res.* 37 Suppl 3:S430-437
123. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005). Interleukin 17-producing cd4+ effector t cells develop via a lineage distinct from the t helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 6:1123-1132
124. Harris HE, Raucii A (2006). Alarmin(g) news about danger: Workshop on innate danger signals and hmgb1. *EMBO Rep.* 7:774-778
125. Hata AN, Breyer RM (2004). Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther.* 103:147-166
126. Hauser CJ, Sursal T, Rodriguez EK, Appleton PT, Zhang Q, Itagaki K (2010). Mitochondrial damage associated molecular patterns from femoralreamings activate neutrophils through formyl peptide receptors and p44/42 map kinase. *J Orthop Trauma.* 24:534-538
127. Hayashida K, Kume N, Murase T, Minami M, Nakagawa D, Inada T, Tanaka M, Ueda A, Kominami G, Kambara H, Kimura T, Kita T (2005). Serum soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 levels are elevated in acute coronary syndrome: A novel marker for early diagnosis. *Circulation.* 112:812-818
128. Hayden MS, Ghosh S (2008). Shared principles in nf-kappab signaling. *Cell.* 132:344-362
129. Henricson BE, Neta R, Vogel SN (1991). An interleukin-1 receptor antagonist blocks lipopolysaccharide-induced colony-stimulating factor production and early endotoxin tolerance. *Infect Immun.* 59:1188-1191
130. Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S (1995). Cytokine mrna expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol.* 146:419-428
131. Huang J, Huen MS, Kim H, Leung CC, Glover JN, Yu X, Chen J (2009). Rad18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair. *Nat Cell Biol.* 11:592-603
132. Huebener P, Abou-Khamis T, Zymek P, Bujak M, Ying X, Chatila K, Haudek S, Thakker G, Frangogiannis NG (2008). Cd44 is critically involved in infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response. *J Immunol.* 180:2625-2633
133. Ishii KJ, Suzuki K, Coban C, Takeshita F, Itoh Y, Matoba H, Kohn LD, Klinman DM (2001). Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of apcs. *The Journal of Immunology.* 167:2602-2607
134. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S (1998). Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase a-deficient mice. *Cancer Research.* 58:1048-1051
135. Ivey CL, Williams FM, Collins PD, Jose PJ, Williams TJ (1995). Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit. Evidence for a role for c5a and interleukin-8. *J Clin Invest.* 95:2720-2728
136. Iwata Y, Yoshizaki A, Komura K, Shimizu K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Bae S, Takenaka M, Yukami T, Hasegawa M, Fujimoto M, Tomita Y, Tedder TF, Sato S (2009). Cd19, a response regulator of b lymphocytes, regulates wound healing through hyaluronan-induced tlr4 signaling. *Am J Pathol.* 175:649-660
137. Jemmerson R, LaPlante B, Treeful A (2002). Release of intact, monomeric cytochrome c from apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ.* 9:538-548
138. Jeong J-W, Cha H-J, Yu D-Y, Seiki M, Kim K-W (1999). Induction of membrane-type matrix metalloproteinase-1 stimulates angiogenic activities of bovine aortic endothelial cells. *Angiogenesis.* 3:167-174.

139. Jiang C, Ting AT, Seed B (1998). Ppar-[gamma] agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 391:82-86
140. Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R, Noble PW (2005). Regulation of lung injury and repair by toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med*. 11:1173-1179
141. Joosten JJ, van Muijen GN, Wobbles T, Ruers TJ (2003). Cryosurgery of tumor tissue causes endotoxin tolerance through an inflammatory response. *Anticancer Res*. 23:427-432
142. Kakio T, Matsumori A, Ono K, Ito H, Matsushima K, Sasayama S (2000). Roles and relationship of macrophages and monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart. *Lab Invest*. 80:1127-1136
143. Kariko K, Weissman D, Welsh FA (2004). Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling[mdash]a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab*. 24:1288-1304
144. Karp CL, Wysocka M, Ma X, Marovich M, Factor RE, Nutman T, Armant M, Wahl L, Cuomo P, Trinchieri G (1998). Potent suppression of il-12 production from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. *Eur J Immunol*. 28:3128-3136
145. Karpinski L, Plaksej R, Kosmala W, Witkowska M (2008). Serum levels of interleukin-6, interleukin-10 and c-reactive protein in relation to left ventricular function in patients with myocardial infarction treated with primary angioplasty. *Kardiol Pol*. 66:1279-1285
146. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S (2001). Lipopolysaccharide stimulates the myd88-independent pathway and results in activation of ifn-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*. 167:5887-5894
147. Kawai T, Akira S (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol*. 11:373-384
148. Keel M, Schrengenberger N, Steckholzer U, Ungethum U, Kenney J, Trentz O, Ertel W (1996). Endotoxin tolerance after severe injury and its regulatory mechanisms. *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 41:430-438
149. Kempf T, Zarbock A, Widera C, Butz S, Stadtmann A, Rossaint J, Bolomini-Vittori M, Korf-Klingebiel M, Napp LC, Hansen B, Kanwischer A, Bavendiek U, Beutel G, Hapke M, Sauer MG, Laudanna C, Hogg N, Vestweber D, Wollert KC (2011). Gdf-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat Med*. 17:581-588
150. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL (2008). Unc93b1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*. 452:234-238
151. Kluwe J, Mencin A, Schwabe RF (2009). Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. *J Mol Med (Berl)*. 87:125-138
152. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Jr., Medzhitov R, Flavell RA (2002). Irak-m is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *Cell*. 110:191-202
153. Kobayashi KS, Flavell RA (2004). Shielding the double-edged sword: Negative regulation of the innate immune system. *J Leukoc Biol*. 75:428-433
154. Kobayashi T, Kouzaki H, Kita H (2010). Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine atp. *J Immunol*. 184:6350-6358

155. Kohler C, Radpour R, Barekati Z, Asadollahi R, Bitzer J, Wight E, Burki N, Diesch C, Holzgreve W, Zhong XY (2009). Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer*. 8:105
156. Kono H, Rock KL (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 8:279-289
157. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009). IL-17 and Th17 cells. *Annual Review of Immunology*. 27:485-517
158. Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T (1995). Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation*. 92:1084-1088
159. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M, Udalova IA (2011). Irf5 promotes inflammatory macrophage polarization and Th1-Th17 responses. *Nat Immunol*. 12:231-238
160. Kuang DM, Wu Y, Chen N, Cheng J, Zhuang SM, Zheng L (2007). Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes. *Blood*. 110:587-595
161. Kukiela GL, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, Hughes BJ, Youker KA, Hawkins HK, Michael LH, et al. (1995). Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest*. 95:89-103
162. Kumar S, Jack R (2006). Origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells. *J Endotoxin Res*. 12:278-284
163. Kume N, Mitsuoka H, Hayashida K, Tanaka M, Kita T (2010). Soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 predicts prognosis after acute coronary syndrome--a pilot study. *Circ J*. 74:1399-1404
164. Kwon AH, Qiu Z, Nagahama H, Kaibori M, Kamiyama Y (2004). Fibronectin suppresses apoptosis and protects mice from endotoxic shock. *Transplant Proc*. 36:2432-2435
165. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM (1995). IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest*. 96:2304-2310
166. Lam NY, Rainer TH, Chan LY, Joynt GM, Lo YM (2003). Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin Chem*. 49:1286-1291
167. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang Y-H, Homey B, Cao W, Wang Y-H, Su B, Nestle FO, Zlotnik T, Mellman I, Schroder J-M, Liu Y-J, Gilliet M (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 449:564-569
168. Le Jan S, Amy C, Cazes A, Monnot C, Lamande N, Favier J, Philippe J, Sibony M, Gasc JM, Corvol P, Germain S (2003). Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *Am J Pathol*. 162:1521-1528
169. Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T (2001). Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol*. 166:5161-5167
170. Lemaire LC, van der Poll T, van Lanschot JJ, Endert E, Buurman WA, van Deventer SJ, Gouma DJ (1998). Minimally invasive surgery induces endotoxin-tolerance in the absence of detectable endotoxemia. *J Clin Immunol*. 18:414-420

171. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in *drosophila* adults. *Cell*. 86:973-983
172. Levine GN, Keaney JF, Jr., Vita JA (1995). Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. *N Engl J Med*. 332:512-521
173. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2003). 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. *Crit Care Med*. 31:1250-1256
174. Liang H, Coles AH, Zhu Z, Zayas J, Jurecic R, Kang J, Jones SN (2007). Noncanonical wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development. *The Journal of Experimental Medicine*. 204:3077-3084
175. Libby P (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 420:868-874
176. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA (2005). Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. 5:446-458
177. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L (2000). Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. Frisc study group. *Fragmin during instability in coronary artery disease*. *N Engl J Med*. 343:1139-1147
178. Liuzzo G, Biasucci LM, Rebuzzi AG, Gallimore JR, Caligiuri G, Lanza GA, Quaranta G, Monaco C, Pepys MB, Maseri A (1996). Plasma protein acute-phase response in unstable angina is not induced by ischemic injury. *Circulation*. 94:2373-2380
179. Loo YM, Gale M, Jr. (2011). Immune signaling by rig-i-like receptors. *Immunity*. 34:680-692
180. Lopez-Collazo E, Fuentes-Prior P, Arnalich F, del Fresno C (2006). Pathophysiology of interleukin-1 receptor-associated kinase-m: Implications in refractory state. *Curr Opin Infect Dis*. 19:237-244
181. Lotfi R, Lee JJ, Lotze MT (2007). Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (damps): Role in the inflammatory response within tumors. *J Immunother*. 30:16-28
182. Lu CH, Chang WN, Tsai NW, Chuang YC, Huang CR, Wang HC (2010). The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in adult community-acquired bacterial meningitis. *QJM*. 103:169-175
183. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008). Lps/tlr4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 42:145-151
184. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 117:175-184
185. Ma FX, Zhou B, Chen Z, Ren Q, Lu SH, Sawamura T, Han ZC (2006). Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Lipid Res*. 47:1227-1237
186. Ma W, Gee K, Lim W, Chambers K, Angel JB, Kozlowski M, Kumar A (2004). Dexamethasone inhibits il-12p40 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells by down-regulating the activity of c-jun n-terminal kinase, the activation protein-1, and nf-kb transcription factors. *The Journal of Immunology*. 172:318-330
187. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A (1995). Dendritic cells produce il-12 and direct the development of th1 cells from naive cd4+ t cells. *J Immunol*. 154:5071-5079



188. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA (2002). Rapid measurement of b-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med.* 347:161-167
189. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002). Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized m2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23:549-555
190. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25:677-686
191. Mantovani A, Garlanda C, Locati M (2009). Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: A question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:1419-1423
192. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13:453-461
193. Mashima R, Saeki K, Aki D, Minoda Y, Takaki H, Sanada T, Kobayashi T, Aburatani H, Yamanashi Y, Yoshimura A (2005). Fln29, a novel interferon- and Ips-inducible gene acting as a negative regulator of toll-like receptor signaling. *J Biol Chem.* 280:41289-41297
194. Mathison JC, Virca GD, Wolfson E, Tobias PS, Glaser K, Ulevitch RJ (1990). Adaptation to bacterial lipopolysaccharide controls lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in rabbit macrophages. *J Clin Invest.* 85:1108-1118
195. Matzinger P (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 12:991-1045
196. Matzinger P (2002). The danger model: A renewed sense of self. *Science.* 296:301-305
197. Medina I, Carbonell J, Pulido L, Madeira SC, Goetz S, Conesa A, Tarraga J, Pascual-Montano A, Nogales-Cadenas R, Santoyo J, Garcia F, Marba M, Montaner D, Dopazo J (2010). Babelomics: An integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res.* 38:W210-213
198. Medvedev AE, Henneke P, Schromm A, Lien E, Ingalls R, Fenton MJ, Golenbock DT, Vogel SN (2001). Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in chinese hamster ovary/cd14 cells is not affected by overexpression of toll-like receptors 2 or 4. *The Journal of Immunology.* 167:2257-2267
199. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997). A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 388:394-397
200. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA, Jr. (1998). Myd88 is an adaptor protein in the htoll/il-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell.* 2:253-258
201. Medzhitov R, Janeway C, Jr. (2000). Innate immune recognition: Mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 173:89-97
202. Medzhitov R (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 449:819-826
203. Mendoza-Barbera E, Corral-Rodriguez MA, Soares-Schanoski A, Velarde M, Macieira S, Messerschmidt A, Lopez-Collazo E, Fuentes-Prior P (2009). Contribution of globular death domains and unstructured linkers to myd88.Irak-4 heterodimer formation: An explanation for the antagonistic activity of myd88s. *Biochem Biophys Res Commun.* 380:183-187

204. Miller TJ, Knapton A, Adeyemo O, Noory L, Weaver J, Hanig JP (2008). Cytochrome c: A non-invasive biomarker of drug-induced liver injury. *J Appl Toxicol.* 28:815-828
205. Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, Otchwemah RN, Dietz E, Ehrhardt S, Schroder NW, Bienzle U, Schumann RR (2006). Toll-like receptor (tlr) polymorphisms in african children: Common tlr-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:177-182
206. Mocsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA (2002). Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity.* 16:547-558
207. Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM, Billiar TR (2006). Emerging paradigm: Toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock.* 26:430-437
208. Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A (2004). The anti-inflammatory response dominates after septic shock: Association of low monocyte hla-dr expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett.* 95:193-198
209. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A (2008). Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: A new skin for the old ceremony. *Mol Med.* 14:64-78
210. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT (1994). Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation.* 90:775-778
211. Mosmann T, Cherwinski H, Bond M, Giedlin M, Coffman R (1986). Two types of murine helper t cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology.* 136:2348-2357
212. Mosmann TR (1994). Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol.* 56:1-26
213. Mosmann TR, Sad S (1996). The expanding universe of t-cell subsets: Th1, th2 and more. *Immunol Today.* 17:138-146
214. Mosser DM, Edwards JP (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8:958-969
215. Mosser DM, Zhang X (2008). Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 226:205-218
216. Mostafa Mtairag E, Chollet-Martin S, Oudghiri M, Laquay N, Jacob MP, Michel JB, Feldman LJ (2001). Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and mmp-9/timp-1 secretion. *Cardiovasc Res.* 49:882-890
217. Murakami M, Simons M (2009). Regulation of vascular integrity. *J Mol Med (Berl).* 87:571-582
218. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 8:618-631
219. Muto J, Yamasaki K, Taylor KR, Gallo RL (2009). Engagement of cd44 by hyaluronan suppresses tlr4 signaling and the septic response to lps. *Molecular Immunology.* 47:449-456
220. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W, Jr., Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT (2003). From vulnerable plaque to vulnerable patient: A call for new definitions and risk assessment strategies: Part i. *Circulation.* 108:1664-1672

221. Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK (2009). Mir-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: Implication in innate immunity. *J Biol Chem.* 284:34590-34599
222. Nahid MA, Satoh M, Chan EK (2011). Mechanistic role of microRNA-146a in endotoxin-induced differential cross-regulation of tlr signaling. *J Immunol.* 186:1723-1734
223. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK (2010). Monocytes: Protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation.* 121:2437-2445
224. Namikoshi T, Satoh M, Horike H, Fujimoto S, Arakawa S, Sasaki T, Kashihara N (2006). Implication of peritubular capillary loss and altered expression of vascular endothelial growth factor in iga nephropathy. *Nephron Physiol.* 102:p9-16
225. Nathan C (2002). Points of control in inflammation. *Nature.* 420:846-852
226. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P (2004). Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res.* 94:1543-1553
227. Nikolaos G F (2008). The immune system and cardiac repair. *Pharmacological Research.* 58:88-111
228. Nimah M, Zhao B, Denenberg AG, Bueno O, Molken J, Wong HR, Shanley TP (2005). Contribution of mkp-1 regulation of p38 to endotoxin tolerance. *Shock.* 23:80-87
229. Noda M, Kariura Y, Pannasch U, Nishikawa K, Wang L, Seike T, Ifuku M, Kosai Y, Wang B, Nolte C, Aoki S, Kettenmann H, Wada K (2007). Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. *J Neurochem.* 101:397-410
230. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S (2000). Cutting edge: Endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *The Journal of Immunology.* 164:3476-3479
231. O'Connor RE, Bossaert L, Arntz HR, Brooks SC, Diercks D, Feitosa-Filho G, Nolan JP, Vanden Hoek TL, Walters DL, Wong A, Welsford M, Woolfrey K (2010). Part 9: Acute coronary syndromes: 2010 international consensus on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment recommendations. *Circulation.* 122:S422-465
232. Ogle CK, Guo X, Chance WT, Ogle JD (1997). Induction of endotoxin tolerance in rat bone marrow cells by in vivo infusion of tumor necrosis factor. *Crit Care Med.* 25:827-833
233. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H (2000). Cutting edge: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol.* 164:558-561
234. Opal SM, DePalo VA (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 117:1162-1172
235. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA (2006). Controversies in ventricular remodelling. *Lancet.* 367:356-367
236. Osterloh A, Breloer M (2008). Heat shock proteins: Linking danger and pathogen recognition. *Med Microbiol Immunol.* 197:1-8
237. Osterud B, Bjorklid E (2003). Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev.* 83:1069-1112
238. Palm NW, Medzhitov R (2009). Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 227:221-233



239. Palumbo R, Bianchi ME (2004). High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochem Pharmacol.* 68:1165-1170
240. Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Reiter RJ, Ruggiero FM (2010). Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J Pineal Res.* 48:297-310
241. Parisi MA, Clayton DA (1991). Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science.* 252:965-969
242. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005). A distinct lineage of cd4 t cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 6:1133-1141
243. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E (2006). High mobility group box 1 protein interacts with multiple toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290:C917-924
244. Pataki M, Lusztig G, Robenek H (1992). Endocytosis of oxidized ldl and reversibility of migration inhibition in macrophage-derived foam cells in vitro. A mechanism for atherosclerosis regression? *Arterioscler Thromb.* 12:936-944
245. Paulus WJ (2000). Cytokines and heart failure. *Heart Fail Monit.* 1:50-56
246. Pena OM, Pistolic J, Raj D, Fjell CD, Hancock REW (2011). Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (m2) in human mononuclear cells. *The Journal of Immunology.* 186:7243-7254
247. Pereira S, Lowell C (2003). The lyn tyrosine kinase negatively regulates neutrophil integrin signaling. *The Journal of Immunology.* 171:1319-1327
248. Peter L (2006). Atherosclerosis: Disease biology affecting the coronary vasculature. *The American Journal of Cardiology.* 98:S3-S9
249. Pfeffer MA, Braunwald E (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 81:1161-1172
250. Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, Dieli F, Ghisletti S, Natoli G, De Baetselier P, Mantovani A, Sica A (2009). Tolerance and m2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappa b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:14978-14983
251. Puccetti P, Belladonna ML, Grohmann U (2002). Effects of il-12 and il-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Crit Rev Immunol.* 22:373-390
252. Pugh CW, Ratcliffe PJ (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the hif system. *Nat Med.* 9:677-684
253. Pullerits R, Bokarewa M, Jonsson IM, Verdrengh M, Tarkowski A (2005). Extracellular cytochrome c, a mitochondrial apoptosis-related protein, induces arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 44:32-39
254. Rabiet MJ, Huet E, Boulay F (2005). Human mitochondria-derived n-formylated peptides are novel agonists equally active on fpr and fprl1, while listeria monocytogenes-derived peptides preferentially activate fpr. *Eur J Immunol.* 35:2486-2495
255. Radhakrishnan J, Wang S, Ayoub IM, Kolarova JD, Levine RF, Gazmuri RJ (2007). Circulating levels of cytochrome c after resuscitation from cardiac arrest: A marker of mitochondrial injury and predictor of survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292:H767-775

256. Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, Volk HD (1995). Mechanism of endotoxin desensitization: Involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 181:1887-1892
257. Raoof M, Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ (2010). Mitochondrial peptides are potent immune activators that activate human neutrophils via fpr-1. *J Trauma.* 68:1328-1332; discussion 1332-1324
258. Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH (2001). Thrombus formation on atherosclerotic plaques: Pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med.* 134:224-238
259. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-[gamma] is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 391:79-82
260. Ringner M (2008). What is principal component analysis? *Nat Biotechnol.* 26:303-304
261. Roberts R, DeMello V, Sobel BE (1976). Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation.* 53:1204-206
262. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H (2010). The sterile inflammatory response. *Annual Review of Immunology.* 28:321-342
263. Rollinghoff M (1997). Immunity, components of the immune system and immune response. *Biologicals.* 25:165-168
264. Ross R, Glomset JA (1976). The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med.* 295:369-377
265. Ross R (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340:115-126
266. Rouleau JL, de Champlain J, Klein M, Bichet D, Moye L, Packer M, Dagenais GR, Sussex B, Arnold JM, Sestier F, et al. (1993). Activation of neurohumoral systems in postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 22:390-398
267. Sacconi S, Pantano S, Natoli G (2003). Modulation of nf-kappab activity by exchange of dimers. *Mol Cell.* 11:1563-1574
268. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, Li J, Thiagarajan M, White JA, Quackenbush J (2006). Tm4 microarray software suite. *Methods Enzymol.* 411:134-193
269. Sagan L (1967). On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol.* 14:255-274
270. Saito H, Ebisawa M, Reason DC, Ohno K, Kurihara K, Sakaguchi N, Ohgimi A, Saito E, Akasawa A, Akimoto K, et al. (1991). Extracellular atp stimulates interleukin-dependent cultured mast cells and eosinophils through calcium mobilization. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 94:68-70
271. Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K, Akira S (2000). Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (tlr) 2- and tlr4-mediated signaling pathways. *J Immunol.* 165:7096-7101
272. Sato S, Takeuchi O, Fujita T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S (2002). A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting myd88-dependent and -independent pathways. *International Immunology.* 14:783-791
273. Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR (2006). Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging tlr2. *J Immunol.* 177:1272-1281

274. Schmidt T, Carmeliet P (2010). Blood-vessel formation: Bridges that guide and unite. *Nature*. 465:697-699
275. Seong SY, Matzinger P (2004). Hydrophobicity: An ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. 4:469-478
276. Shah PK (2007). Molecular mechanisms of plaque instability. *Curr Opin Lipidol*. 18:492-499
277. Shao G, Julian MW, Bao S, McCullers MK, Lai JP, Knoell DL, Crouser ED (2011). Formyl peptide receptor ligands promote wound closure in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 44:264-269
278. Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, Greenberg AS, Obin MS (2010). Dynamic, m2-like remodeling phenotypes of cd11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet-induced obesity in mice. *Diabetes*. 59:1171-1181
279. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 18:385-405
280. Simon AD, Yazdani S, Wang W, Schwartz A, Rabbani LE (2001). Elevated plasma levels of interleukin-2 and soluble il-2 receptor in ischemic heart disease. *Clin Cardiol*. 24:253-256
281. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, Boren J (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 417:750-754
282. Smiley ST, King JA, Hancock WW (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol*. 167:2887-2894
283. Smith DA, Irving SD, Sheldon J, Cole D, Kaski JC (2001). Serum levels of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 are decreased in patients with unstable angina. *Circulation*. 104:746-749
284. Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL, Orringer MB, Whyte RI, Burdick MD, Wilke CA, Strieter RM (1994). Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *The Journal of Experimental Medicine*. 179:1409-1415
285. Smyth GK (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 3:Article3
286. Soares-Schanoski A, Gomez-Pina V, del Fresno C, Rodriguez-Rojas A, Garcia F, Glaria A, Sanchez M, Vallejo-Cremades MT, Baos R, Fuentes-Prior P, Arnalich F, Lopez-Collazo E (2007). 6-methylprednisolone down-regulates irak-m in human and murine osteoclasts and boosts bone-resorbing activity: A putative mechanism for corticoid-induced osteoporosis. *J Leukoc Biol*. 82:700-709
287. Sorice M, Circella A, Cristea IM, Garofalo T, Di Renzo L, Alessandri C, Valesini G, Esposti MD (2004). Cardiolipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis. *Cell Death Differ*. 11:1133-1145
288. Sorrentino R, Morello S, Chen S, Bonavita E, Pinto A (2010). The activation of liver x receptors inhibits toll-like receptor-9-induced foam cell formation. *J Cell Physiol*. 223:158-167
289. Stehbens WE (1990). The lipid hypothesis and the role of hemodynamics in atherogenesis. *Prog Cardiovasc Dis*. 33:119-136
290. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S (1992). Interleukin 4 potentially enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 176:287-292

291. Steinberg D (1993). Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *J Intern Med.* 233:227-232
292. Struck J, Uhlein M, Morgenthaler NG, Furst W, Hoflich C, Bahrami S, Bergmann A, Volk HD, Redl H (2005). Release of the mitochondrial enzyme carbamoyl phosphate synthase under septic conditions. *Shock.* 23:533-538
293. Sulahian TH, Hogger P, Wahner AE, Wardwell K, Goulding NJ, Sorg C, Droste A, Stehling M, Wallace PK, Morganelli PM, Guyre PM (2000). Human monocytes express cd163, which is upregulated by il-10 and identical to p155. *Cytokine.* 12:1312-1321
294. Sullivan DR, Marwick TH, Freedman SB (1990). A new method of scoring coronary angiograms to reflect extent of coronary atherosclerosis and improve correlation with major risk factors. *Am Heart J.* 119:1262-1267
295. Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, Yeh WC (2002). Severe impairment of interleukin-1 and toll-like receptor signalling in mice lacking irak-4. *Nature.* 416:750-756
296. Suzuki R, Shimodaira H (2006). Pvcust: An r package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics.* 22:1540-1542
297. Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR (1996). Chromosomal localization of til, a gene encoding a protein related to the drosophila transmembrane receptor toll, to human chromosome 4p14. *Genomics.* 32:486-488
298. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T (2007). Dai (dIm-1/zbp1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature.* 448:501-505
299. Takeda K, Akira S (2001). Roles of toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells.* 6:733-742
300. Takeshita S, Isshiki T, Ochiai M, Ishikawa T, Nishiyama Y, Fusano T, Toyozumi H, Kondo K, Ono Y, Sato T (1997). Systemic inflammatory responses in acute coronary syndrome: Increased activity observed in polymorphonuclear leukocytes but not t lymphocytes. *Atherosclerosis.* 135:187-192
301. Taniguchi N, Yoshida K, Ito T, Tsuda M, Mishima Y, Furumatsu T, Ronfani L, Abeyama K, Kawahara K, Komiya S, Maruyama I, Lotz M, Bianchi ME, Asahara H (2007). Stage-specific secretion of hmgb1 in cartilage regulates endochondral ossification. *Mol Cell Biol.* 27:5650-5663
302. Thapa B, Kim YH, Kwon H-J, Kim D-S (2012). Novel regulatory mechanism and functional implication of plasminogen activator inhibitor-1 (pai-1) expression in cpg-odn-stimulated macrophages. *Molecular Immunology.* 49:572-581
303. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ (2007). Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by hmgb1 and rage. *Nat Immunol.* 8:487-496
304. Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, Vogel SN (2002). Tlr4, but not tlr2, mediates ifn-beta-induced stat1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol.* 3:392-398

305. Tosi MF (2005). Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol.* 116:241-249; quiz 250
306. Trinchieri G (1995). Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual Review of Immunology.* 13:251-276
307. Tsai N-W, Lin T-K, Chen S-D, Chang W-N, Wang H-C, Yang T-M, Lin Y-J, Jan C-R, Huang C-R, Liou C-W, Lu C-H (2011). The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. *Clinica Chimica Acta.* 412:476-479
308. Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schuttler J (2002). Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-dr expression, procalcitonin, c-reactive protein, and changes in t-cell subsets in septic and postoperative patients. *Crit Care Med.* 30:1015-1023
309. Valesini G, Alessandri C (2005). New facet of antiphospholipid antibodies. *Ann N Y Acad Sci.* 1051:487-497
310. van 't Veer C, van den Pangaart PS, van Zoelen MA, de Kruif M, Birjmohun RS, Stroes ES, de Vos AF, van der Poll T (2007). Induction of irak-m is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. *J Immunol.* 179:7110-7120
311. van Baarlen P, van Esse HP, Siezen RJ, Thomma BP (2008). Challenges in plant cellular pathway reconstruction based on gene expression profiling. *Trends Plant Sci.* 13:44-50
312. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK (1994). Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* 89:36-44
313. Varadarajan SG, An J, Novalija E, Smart SC, Stowe DF (2001). Changes in [na(+)](i), compartmental [ca(2+)], and nadh with dysfunction after global ischemia in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:H280-293
314. Vecchione L, Gargiul E, Borgiani P, Predazzi I, Mango R, Romeo F, Magnani M, Novelli G (2007). Genotyping olr1 gene: A genomic biomarker for cardiovascular diseases. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2:147-151
315. Venegas V, Wang J, Dimmock D, Wong LJ (2011). Real-time quantitative pcr analysis of mitochondrial DNA content. *Curr Protoc Hum Genet.* Chapter 19:Unit 19 17
316. Volk HD, Reinke P, Docke WD (2000). Clinical aspects: From systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol.* 74:162-177
317. Volk HD (2002). Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care.* 6:279-281
318. Watson DW, Kim YB (1963). Modification of host responses to bacterial endotoxins. I. Specificity of pyrogenic tolerance and the role of hypersensitivity in pyrogenicity, lethality, and skin reactivity. *J Exp Med.* 118:425-446
319. Weissberg PL (2000). Atherogenesis: Current understanding of the causes of atheroma. *Heart.* 83:247-252
320. Wesche H, Gao X, Li X, Kirschning CJ, Stark GR, Cao Z (1999). Irak-m is a novel member of the pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (irak) family. *J Biol Chem.* 274:19403-19410

321. West AP, Koblansky AA, Ghosh S (2006). Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:409-437
322. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ (1987). Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation.* 76:44-51
323. Willerson JT, Campbell WB, Winniford MD, Schmitz J, Apprill P, Firth BG, Ashton J, Smitherman T, Bush L, Buja LM (1984). Conversion from chronic to acute coronary artery disease: Speculation regarding mechanisms. *Am J Cardiol.* 54:1349-1354
324. Willerson JT, Hillis LD, Winniford M, Buja LM (1986). Speculation regarding mechanisms responsible for acute ischemic heart disease syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 8:245-250
325. Wolk K, Docke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R (2000). Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood.* 96:218-223
326. Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatellis G, Yurt RW, Cerami A (1989). Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:612-616
327. Wood D, De Backer G, Faergeman O, Graham I, Mancia G, Pyorala K (1998). Prevention of coronary heart disease in clinical practice: Recommendations of the second joint task force of european and other societies on coronary prevention. *Atherosclerosis.* 140:199-270
328. Worthley SG, Osende JI, Helft G, Badimon JJ, Fuster V (2001). Coronary artery disease: Pathogenesis and acute coronary syndromes. *Mt Sinai J Med.* 68:167-181
329. Xia Y, Frangogiannis NG (2007). Mcp-1/ccl2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 6:101-107
330. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S (2003). Role of adaptor trif in the myd88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 301:640-643
331. Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ (1998). Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature.* 395:284-288
332. Yasuda K, Yu P, Kirschning CJ, Schlatter B, Schmitz F, Heit A, Bauer S, Hochrein H, Wagner H (2005). Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via tlr9-dependent and -independent pathways. *The Journal of Immunology.* 174:6129-6136
333. Yellon DM, Hausenloy DJ (2007). Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 357:1121-1135
334. Yeung AC, Vekshtein VI, Krantz DS, Vita JA, Ryan TJ, Jr., Ganz P, Selwyn AP (1991). The effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress. *N Engl J Med.* 325:1551-1556
335. Yoshida H, Kondratenko N, Green S, Steinberg D, Quehenberger O (1998). Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J.* 334 ( Pt 1):9-13
336. Yoza BK, Hu JY, Cousart SL, Forrest LM, McCall CE (2006). Induction of relb participates in endotoxin tolerance. *J Immunol.* 177:4080-4085
337. Zeilhofer HU, Schorr W (2000). Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Curr Opin Hematol.* 7:178-182



- 338. Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ (2010). Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock*. 34:55-59
- 339. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 464:104-107
- 340. Zhu J, Yamane H, Paul WE (2010). Differentiation of effector cd4 t cell populations (\*). *Annu Rev Immunol*. 28:445-489
- 341. Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, Strobel M, Wendelgass P, Sternsdorf T, Bauerle PA, Haas JG, Riethmuller G (1994). Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa b with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem*. 269:17001-17004.

## 8. ANEXOS





**Tabla A1. Genes sobre-expresados diferenciablemente en las CMSP de pacientes de SCACEST comparado con pacientes de AI.**

Sobre-expresados en SCACEST		
Símbolo	Fold Change	Descripción
OLR1	3,894	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1
ANGPTL4	3,391	angiopoietin-like 4
MLXIPL	3,031	MLX interacting protein-like
PTGES	2,986	prostaglandin E synthase
WNT5A	2,963	wingless-type MMTV integration site family, member 5A
SYN1	2,819	synapsin I
A4GALT	2,722	alpha 1,4-galactosyltransferase
SEMA6B	2,708	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6B
FN1	2,6	fibronectin 1
SERPINE1	2,333	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
SDS	2,279	serine dehydratase
IFITM10	2,219	interferon induced transmembrane protein 10
KIAA1274	2,141	KIAA1274
RDH12	2,094	retinol dehydrogenase 12 (all-trans/9-cis/11-cis)
FLJ32742	2,071	hypothetical locus FLJ32742
SERPINB2	2,051	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2
NCS1	2,022	neuronal calcium sensor 1
FUT3	2,02	fucosyltransferase 3 (galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase, Lewis blood group)
IL8	2,003	interleukin 8
C15orf48	1,983	chromosome 15 open reading frame 48
CST6	1,918	cystatin E/M
TGM2	1,916	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)
PMEPA1	1,914	prostate transmembrane protein, androgen induced 1
FAM3B	1,913	family with sequence similarity 3, member B
KDM6B	1,864	lysine (K)-specific demethylase 6B
AHRR	1,807	aryl-hydrocarbon receptor repressor
IL10	1,802	interleukin 10
SLCO4A1	1,786	solute carrier organic anion transporter family, member 4A1
SH3RF3	1,759	SH3 domain containing ring finger 3
ADRA2B	1,754	adrenergic, alpha-2B-, receptor
SMAD6	1,754	SMAD family member 6
CCL20	1,753	chemokine (C-C motif) ligand 20
CXCR7	1,727	chemokine (C-X-C motif) receptor 7
RBM47	1,724	RNA binding motif protein 47
PVRL4	1,718	poliovirus receptor-related 4

Sobre-expresados en SCACEST		
Símbolo	Fold Change	Descripción
TANC2	1,712	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 2
CNDP1	1,671	carnosine dipeptidase 1 (metallopeptidase M20 family)
NKD1	1,666	naked cuticle homolog 1 (Drosophila)
IL1R2	1,657	interleukin 1 receptor, type II
LGMN	1,657	legumain
APOC2	1,653	apolipoprotein C-II
SMC4	1,652	structural maintenance of chromosomes 4
COL8A2	1,634	collagen, type VIII, alpha 2
DNAH2	1,633	dynein, axonemal, heavy chain 2
TMEM51	1,624	transmembrane protein 51
CTNND1	1,619	catenin (cadherin-associated protein), delta 1
ANKDD1A	1,618	ankyrin repeat and death domain containing 1A
HAS1	1,607	hyaluronan synthase 1
UNC5B	1,595	unc-5 homolog B (C, elegans)
AMPH	1,59	amphiphysin
LOC100133920	1,584	hypothetical LOC100133920
FLJ11292	1,582	hypothetical protein FLJ11292
CTAG1B	1,581	cancer/testis antigen 1B
GPR97	1,581	G protein-coupled receptor 97
DUOXA1	1,568	dual oxidase maturation factor 1
BTNL3	1,552	butyrophilin-like 3
BAGE4	1,545	B melanoma antigen family, member 4
DDR2	1,533	discoidin domain receptor tyrosine kinase 2
ENG	1,527	endoglin
SNAI1	1,515	snail homolog 1 (Drosophila)
SCN4B	1,495	sodium channel, voltage-gated, type IV, beta
FAM20A	1,492	family with sequence similarity 20, member A
VEGFA	1,487	vascular endothelial growth factor A
TLCD2	1,484	TLC domain containing 2
VASH1	1,477	vasohibin 1
RHBDL3	1,476	rhomboid, veinlet-like 3 (Drosophila)
GABARAPL3	1,455	GABA(A) receptors associated protein like 3, pseudogene
GPX3	1,447	glutathione peroxidase 3 (plasma)
SPP1	1,441	secreted phosphoprotein 1
BRIP1	1,413	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
DOCK4	1,395	dedicator of cytokinesis 4
PPARG	1,393	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
BCAT1	1,388	branched chain amino-acid transaminase 1, cytosolic
REM2	1,386	RAS (RAD and GEM)-like GTP binding 2
DACT3	1,371	dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 3 (Xenopus laevis)
FURIN	1,371	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)

Sobre-expresados en SCACEST		
Símbolo	Fold Change	Descripción
ANLN	1,361	anillin, actin binding protein
LPCAT1	1,357	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1
MARCKSL1	1,357	MARCKS-like 1
TRH	1,357	thyrotropin-releasing hormone
FOSB	1,353	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
TGFA	1,353	transforming growth factor, alpha
ARHGAP8/PRR5-ARHGAP8	1,351	Rho GTPase activating protein 8
SERPINB10	1,345	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10
HSPA2	1,327	heat shock 70kDa protein 2
C17orf76	1,326	chromosome 17 open reading frame 76
GAS2L3	1,326	growth arrest-specific 2 like 3
TPST1	1,323	tyrosylprotein sulfotransferase 1
OSM	1,318	oncostatin M
LOC100507494	1,315	hypothetical protein LOC100507494
MRC2	1,314	mannose receptor, C type 2
INTS2	1,306	integrator complex subunit 2
KCNQ4	1,305	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 4
DSE	1,294	dermatan sulfate epimerase
TRPV4	1,293	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4
FKBP9L	1,276	FK506 binding protein 9-like
IER3	1,276	immediate early response 3
KRT20	1,276	keratin 20
PPP4R1L	1,272	protein phosphatase 4, regulatory subunit 1-like
BCAR3	1,27	breast cancer anti-estrogen resistance 3
CXCL2	1,27	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
APOC1	1,261	apolipoprotein C-I
MTHFD1L	1,253	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like
SLC25A37	1,253	solute carrier family 25, member 37
JAKMIP3	1,249	Janus kinase and microtubule interacting protein 3
NT5DC2	1,245	5'-nucleotidase domain containing 2
HIC1	1,243	hypermethylated in cancer 1
LOC100499177	1,235	hypothetical LOC100499177
CUX1	1,231	cut-like homeobox 1
LOC339524	1,225	hypothetical LOC339524
NUPR1	1,208	nuclear protein, transcriptional regulator, 1
OR10A4	1,207	olfactory receptor, family 10, subfamily A, member 4
PLAU	1,203	plasminogen activator, urokinase
SKIL	1,202	SKI-like oncogene
PPAP2B	1,197	phosphatidic acid phosphatase type 2B

Sobre-expresados en SCACEST		
Símbolo	Fold Change	Descripción
HAB1	1,19	B1 for mucin
DGCR5	1,183	DiGeorge syndrome critical region gene 5 (non-protein coding)
SRGAP1	1,182	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1
PDE2A	1,18	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated
TRIM6	1,177	tripartite motif containing 6
CAMK2A	1,174	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
CABP2	1,173	calcium binding protein 2
MIR210HG	1,168	MIR210 host gene (non-protein coding)
PRG2	1,166	proteoglycan 2, bone marrow (natural killer cell activator, eosinophil granule major basic protein)
LRCH1	1,164	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 1
PSD2	1,161	pleckstrin and Sec7 domain containing 2
ACTB	1,159	actin, beta
ATP6V1B1	1,159	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1
NLGN3	1,158	neuroligin 3
PANX2	1,158	pannexin 2
LIMK2	1,152	LIM domain kinase 2
C1orf226	1,151	chromosome 1 open reading frame 226
CAMKK1	1,149	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha
SLC2A3	1,149	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
DAPK1	1,145	death-associated protein kinase 1
MSR1	1,143	macrophage scavenger receptor 1
DPYSL3	1,14	dihydropyrimidinase-like 3
PDLIM7	1,139	PDZ and LIM domain 7 (enigma)
TNNT3	1,138	troponin T type 3 (skeletal, fast)
CYP1B1	1,134	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
MYH13	1,133	myosin, heavy chain 13, skeletal muscle
TNFAIP6	1,131	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6
CHRNA4	1,13	cholinergic receptor, nicotinic, beta 4
SLC16A6	1,13	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)
ADORA3	1,129	adenosine A3 receptor
ISLR2	1,129	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat 2
MFAP4	1,124	microfibrillar-associated protein 4
VAV2	1,123	vav 2 guanine nucleotide exchange factor
GTF2IRD1	1,119	GTF2I repeat domain containing 1
EDNRB	1,117	endothelin receptor type B
HS3ST1	1,116	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1
GABARAPL1	1,111	GABA(A) receptor-associated protein like 1
TBC1D16	1,11	TBC1 domain family, member 16
THBS1	1,109	thrombospondin 1

Sobre-expresados en SCACEST		
Símbolo	Fold Change	Descripción
FAM176A	1,107	family with sequence similarity 176, member A
GPR84	1,107	G protein-coupled receptor 84
LOC283143	1,101	hypothetical LOC283143
TLE3	1,1	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)
ADCY4	1,099	adenylate cyclase 4
C8orf51	1,098	chromosome 8 open reading frame 51
MCAM	1,098	melanoma cell adhesion molecule
LOC400456	1,097	hypothetical LOC400456
PLCD3	1,096	phospholipase C, delta 3
PPP1R14D	1,095	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14D
SKI	1,091	v-ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)
PIWIL2	1,084	piwi-like 2 (Drosophila)
MFI2	1,083	antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5
MMP14	1,083	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
ITGA9	1,081	integrin, alpha 9
KRTAP9-8	1,081	keratin associated protein 9-8
LOC100129406	1,081	hypothetical protein LOC100129406
SIAH3	1,081	seven in absentia homolog 3 (Drosophila)
C9orf131	1,073	chromosome 9 open reading frame 131
PLIN5	1,073	perilipin 5
P2RY6	1,071	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6
LOC100505483	1,069	hypothetical LOC100505483
SPRY1	1,065	sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)
MMP2	1,063	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
CCDC57	1,061	coiled-coil domain containing 57
RAI14	1,061	retinoic acid induced 14
RNF19B	1,061	ring finger protein 19B
PLIN4	1,058	perilipin 4
LOC728153	1,055	family with sequence similarity 133, member A pseudogene
MERTK	1,055	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase
ASAP1-IT1	1,054	ASAP1 intronic transcript 1 (non-protein coding)
FCAR	1,054	Fc fragment of IgA, receptor for
C9orf50	1,045	chromosome 9 open reading frame 50
PDS5B	1,043	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog B (S. cerevisiae)
KCNH4	1,041	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 4
MYO10	1,041	myosin X
NOSTRIN	1,041	nitric oxide synthase trafficker
BMP2K	1,039	BMP2 inducible kinase

Sobre-expresados en SCACEST		
Símbolo	Fold Change	Descripción
KCND1	1,039	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 1
FLJ23867	1,038	hypothetical protein FLJ23867
WDFY3	1,036	WD repeat and FYVE domain containing 3
IQCF1	1,035	IQ motif containing F1
LRRC4	1,035	leucine rich repeat containing 4
FLVCR2	1,03	feline leukemia virus subgroup C cellular receptor family, member 2
GJB6	1,03	gap junction protein, beta 6, 30kDa
LOC157627	1,03	hypothetical LOC157627
C9orf47	1,029	chromosome 9 open reading frame 47
AATK	1,027	apoptosis-associated tyrosine kinase
NOTCH1	1,024	notch 1
PPIF	1,023	peptidylprolyl isomerase F
TMEM57	1,022	transmembrane protein 57
AKT3	1,016	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)
CDH26	1,014	cadherin 26
PHACTR1	1,013	phosphatase and actin regulator 1
JUN	1,009	jun proto-oncogene
ATF3	1,008	activating transcription factor 3
RGS16	1,008	regulator of G-protein signaling 16
FLJ40194	1,006	hypothetical FLJ40194
OLIG3	1,005	oligodendrocyte transcription factor 3
ARID5A	1,002	AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)
SCN1B	1,002	sodium channel, voltage-gated, type I, beta

**Tabla A2. Genes con expresión disminuida diferencialmente en CMSP de pacientes de SCACEST comparado con pacientes de AI.**

Expresión disminuida en SCACEST		
Símbolo	Fold Change	Descripción
CLTC	-2,324	clathrin, heavy chain (Hc)
ARPP19	-2,126	cAMP-regulated phosphoprotein, 19kDa
AEN	-1,859	apoptosis enhancing nuclease
CLEC4F	-1,7	C-type lectin domain family 4, member F
IL4	-1,614	interleukin 4
RAD18	-1,59	RAD18 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
MS4A2	-1,584	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2 (Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; beta polypeptide)

Expresión disminuida en SCACEST		
Símbolo	Fold Change	Descripción
RPL22	-1,564	ribosomal protein L22
NPTN	-1,545	neuroplastin
RHOD	-1,528	ras homolog gene family, member D
CLC	-1,515	Charcot-Leyden crystal protein
MMACHC	-1,507	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblC type, with homocystinuria
LOC154822	-1,473	hypothetical LOC154822
PRSS16	-1,418	protease, serine, 16 (thymus)
VPREB1	-1,411	pre-B lymphocyte 1
C18orf23	-1,405	chromosome 18 open reading frame 23
NTN4	-1,379	netrin 4
MGC52282	-1,376	protease, serine, 30 homolog (mouse), pseudogene
DSC1	-1,359	desmocollin 1
VPS26A	-1,357	vacuolar protein sorting 26 homolog A (S. pombe)
IFITM5	-1,354	interferon induced transmembrane protein 5
GCAT	-1,349	glycine C-acetyltransferase
GPM6B	-1,339	glycoprotein M6B
FCRLB	-1,333	Fc receptor-like B
HP1BP3	-1,32	heterochromatin protein 1, binding protein 3
IGFBPL1	-1,315	insulin-like growth factor binding protein-like 1
FAM84B	-1,305	family with sequence similarity 84, member B
PPP1R2P9	-1,3	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2 pseudogene 9
CXCL9	-1,298	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
CSTF3	-1,283	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3, 77kDa
SLC4A10	-1,27	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter, member 10
BAZ1B	-1,266	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B
LCP1	-1,262	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
C10orf82	-1,256	chromosome 10 open reading frame 82
PIK3R1OS	-1,253	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1, opposite strand
LOC100128098	-1,249	hypothetical LOC100128098
SPAG8	-1,248	sperm associated antigen 8
PI16	-1,246	peptidase inhibitor 16
GPM6A	-1,245	glycoprotein M6A
GZMK	-1,231	granzyme K (granzyme 3; tryptase II)
DCUN1D4	-1,227	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 4 (S. cerevisiae)
NLRP7	-1,213	NLR family, pyrin domain containing 7
ANKRD24	-1,212	ankyrin repeat domain 24
HIST1H2BD	-1,209	histone cluster 1, H2bd
NCR3	-1,207	natural cytotoxicity triggering receptor 3
LOC100507419	-1,206	hypothetical LOC100507419



Expresión disminuida en SCACEST		
Símbolo	Fold Change	Descripción
PRKAR2B	-1,204	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta
CYP2J2	-1,201	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2
SNORA78	-1,196	small nucleolar RNA, H/ACA box 78
MRAP	-1,195	melanocortin 2 receptor accessory protein
MLLT3	-1,188	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3
IFNE	-1,186	interferon, epsilon
LYSMD4	-1,184	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 4
OGT	-1,18	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase)
LOC729082	-1,176	hypothetical LOC729082
CBX7	-1,175	chromobox homolog 7
MAF	-1,168	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)
ACOT4	-1,157	acyl-CoA thioesterase 4
TRIM64/ TRIM64B	-1,155	tripartite motif containing 64
GAFA3	-1,153	FGF-2 activity-associated protein 3
ADAR	-1,152	adenosine deaminase, RNA-specific
SLC23A1	-1,14	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 1
CACNG5	-1,126	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5
TXNRD1	-1,12	thioredoxin reductase 1
TKTL1	-1,108	transketolase-like 1
SPINK2	-1,107	serine peptidase inhibitor, Kazal type 2 (acrosin-trypsin inhibitor)
YAP1	-1,103	Yes-associated protein 1
HSD11B1	-1,097	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1
MCF2L-AS1	-1,092	MCF2L antisense RNA 1 (non-protein coding)
IL34	-1,091	interleukin 34
CACNG6	-1,09	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6
IL32	-1,084	interleukin 32
ENPP5	-1,081	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative)
ZP1	-1,079	zona pellucida glycoprotein 1 (sperm receptor)
LOC284889	-1,072	hypothetical LOC284889
CPA3	-1,07	carboxypeptidase A3 (mast cell)
FCER1A	-1,07	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide
EIF4B	-1,067	eukaryotic translation initiation factor 4B
ADAM22	-1,065	ADAM metallopeptidase domain 22
LIPA	-1,065	lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase
WDR78	-1,064	WD repeat domain 78
TMEM182	-1,059	transmembrane protein 182
TEPP	-1,052	testis, prostate and placenta expressed
SSR1	-1,051	signal sequence receptor, alpha
ST6GAL1	-1,048	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1

Expresión disminuida en SCACEST		
Símbolo	Fold Change	Descripción
KIAA1324	-1,047	KIAA1324
PPFIA4	-1,047	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 4
PRDX2	-1,047	peroxiredoxin 2
MYH11	-1,045	myosin, heavy chain 11, smooth muscle
CALU	-1,044	calumenin
NPHS2	-1,044	nephrosis 2, idiopathic, steroid-resistant (podocin)
DCAF7	-1,04	DDB1 and CUL4 associated factor 7
RAB31	-1,04	RAB31, member RAS oncogene family
NUP43	-1,039	nucleoporin 43kDa
RCAN2	-1,035	regulator of calcineurin 2
VPREB3	-1,035	pre-B lymphocyte 3
CYP2A6	-1,031	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6
MSX2P	-1,031	msh homeobox 2 pseudogene 1
MTHFSD	-1,031	methenyltetrahydrofolate synthetase domain containing
LOC284801	-1,03	hypothetical LOC284801
SPIC	-1,019	Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
TMEM14E	-1,019	transmembrane protein 14E
ENPP3	-1,018	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3
MDGA1	-1,015	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 1
LAG3	-1,011	lymphocyte-activation gene 3
TLE2	-1,005	transducin-like enhancer of split 2 (E(sp1) homolog, Drosophila)
PARVA	-1,003	parvin, alpha

Tabla A3. Principales procesos asociados al Sistema Cardiovascular que estarían aumentados en las CMSP de los pacientes de SCACEST y la predicción del efecto los genes implicados.

Función	z-score	Genes	Predicción (basado en la dirección de la expresión)	Fold Change	Descrito previamente (nº Referencias)
Angiogénesis	2,166	PTGES	Aumenta la angiogénesis	2,986	Aumenta (2)
		OLR1	Aumenta la angiogénesis	3,894	Aumenta (4)
		OSM	Aumenta la angiogénesis	1,318	Aumenta (1)
		ENG	Aumenta la angiogénesis	1,527	Aumenta (6)
		EDNRB	Aumenta la angiogénesis	1,117	Aumenta (1)
		MMP2	Aumenta la angiogénesis	1,063	Aumenta (6)
		TGM2	Aumenta la angiogénesis	1,916	Aumenta (1)
		ITGA9	Aumenta la angiogénesis	1,081	Aumenta (2)
		PLAU	Aumenta la angiogénesis	1,203	Aumenta (2)
		JUN	Aumenta la angiogénesis	1,009	Aumenta (4)

Función	z-score	Genes	Predicción (basado en la dirección de la expresión)	Fold Change	Descrito previamente (nº Referencias)
		TGFA	Aumenta la angiogénesis	1,353	Aumenta (2)
		SERPINE1	Aumenta la angiogénesis	2,333	Aumenta (9)
		MMP14	Aumenta la angiogénesis	1,083	Aumenta (7)
		WNT5A	Aumenta la angiogénesis	2,963	Aumenta (1)
		VEGFA	Aumenta la angiogénesis	1,487	Aumenta (150)
		FN1	Aumenta la angiogénesis	2,600	Aumenta (3)
		ADRA2B	Aumenta la angiogénesis	1,754	Aumenta (2)
		IL8	Aumenta la angiogénesis	2,003	Aumenta (11)
		PDE2A	Aumenta la angiogénesis	1,180	Aumenta (6)
		ANGPTL4	Disminuye la angiogénesis	3,391	Disminuye (5)
		OGT	Disminuye la angiogénesis	-1,180	Disminuye (2)
		THBS1	Disminuye la angiogénesis	1,109	Disminuye (21)
		VASH1	Disminuye la angiogénesis	1,477	Disminuye (9)
		UNC5B	Disminuye la angiogénesis	1,595	Disminuye (2)
		PLCD3	Afecta	1,096	Afecta (1)
		IL4	Afecta	-1,614	Afecta (2)
		SPP1	Afecta	1,441	Afecta (2)
		CYP1B1	Afecta	1,134	Afecta (1)
<b>Lesión vascular</b>	1,785	PTGES	Aumentadas las lesiones	2,986	Aumenta (7)
		SERPINE1	Afecta	2,333	Afecta (4)
		VEGFA	Aumentadas las lesiones	1,487	Aumenta (4)
		SPP1	Aumentadas las lesiones	1,441	Aumenta (2)
		FURIN	Afecta	1,371	Afecta (1)
		PLAU	Aumentadas las lesiones	1,203	Aumenta (2)
		THBS1	Afecta	1,109	Afecta (2)
		MMP2	Aumentadas las lesiones	1,063	Aumenta (2)
		IL4	Disminuidas las lesiones	-1,614	Aumenta (3)
<b>Enfermedad vascular</b>	1,676	OLR1	Afecta	3,894	Afecta (2)
		MLXIPL	Afecta	3,031	Afecta (1)
		SERPINE1	Aumentadas las enfermedades	2,333	Aumenta (10)
		IL8	Afecta	2,003	Afecta (1)
		PMEPA1	Afecta	1,914	Afecta (1)
		IL10	Afecta	1,802	Afecta (2)
		ADRA2B	Afecta	1,754	Afecta (2)
		RBM47	Afecta	1,724	Afecta (1)
		NKD1	Afecta	1,666	Afecta (1)
		LGMN	Afecta	1,657	Afecta (1)
		APOC2	Afecta	1,653	Afecta (1)
		AMPH	Afecta	1,590	Afecta (1)
		DDR2	Afecta	1,533	Afecta (4)

Función	z-score	Genes	Predicción (basado en la dirección de la expresión)	Fold Change	Descrito previamente (nº Referencias)
		VEGFA	Afecta	1,487	Afecta (16)
		SPP1	Afecta	1,441	Afecta (1)
		DOCK4	Afecta	1,395	Afecta (4)
		PPARG	Disminuidas las enfermedades	1,393	Disminuye (12)
		BCAT1	Afecta	1,388	Afecta (1)
		TGFA	Afecta	1,353	Afecta (3)
		FOSB	Afecta	1,353	Afecta (3)
		APOC1	Aumentadas las enfermedades	1,261	Aumenta (2)
		MTHFD1L	Afecta	1,253	Afecta (13)
		PLAU	Aumentadas las enfermedades	1,203	Aumenta (9)
		CAMKK1	Afecta	1,149	Afecta (1)
		MSR1	Aumentadas las enfermedades	1,143	Aumenta (3)
		TNFAIP6	Afecta	1,131	Afecta (1)
		CHRNA4	Afecta	1,130	Afecta (1)
		GTF2IRD1	Afecta	1,119	Afecta (1)
		EDNRB	Afecta	1,117	Afecta (35)
		THBS1	Afecta	1,109	Afecta (2)
		FAM176A	Afecta	1,107	Afecta (1)
		MMP14	Afecta	1,083	Afecta (1)
		SIAH3	Afecta	1,081	Afecta (2)
		P2RY6	Afecta	1,071	Afecta (3)
		MMP2	Afecta	1,063	Afecta (9)
		MERTK	Aumentadas las enfermedades	1,055	Aumenta (2)
		MYO10	Afecta	1,041	Afecta (1)
		AKT3	Aumentadas las enfermedades	1,016	Aumenta (1)
		PHACTR1	Afecta	1,013	Afecta (2)
		JUN	Afecta	1,009	Afecta (3)
		SCN1B	Afecta	1,002	Afecta (1)
		PARVA	Afecta	-1,003	Afecta (3)
		MDGA1	Afecta	-1,015	Afecta (1)
		MYH11	Afecta	-1,045	Afecta (1)
		KIAA1324	Afecta	-1,047	Afecta (1)
		EIF4B	Afecta	-1,067	Afecta (1)
		CPA3	Afecta	-1,070	Afecta (1)
		YAP1	Afecta	-1,103	Afecta (1)
		GPM6A	Afecta	-1,245	Afecta (1)
		IL4	Afecta	-1,614	Afecta (2)
		CLEC4F	Afecta	-1,700	Afecta (1)
Daño en tejidos	1,443	FN1	Aumento del daño	2,600	Aumenta (1)
		SERPINE1	Afecta	2,333	Afecta (1)

Función	z-score	Genes	Predicción (basado en la dirección de la expresión)	Fold Change	Descrito previamente (nº Referencias)
		IL8	Aumento del daño	2,003	Aumenta (2)
		TGM2	Disminución del daño	1,916	Disminuye (7)
		IL10	Disminución del daño	1,802	Disminuye (5)
		VEGFA	Afecta	1,487	Afecta (2)
		SPP1	Aumento del daño	1,441	Aumenta (1)
		TGFA	Aumento del daño	1,353	Aumenta (1)
		OSM	Aumento del daño	1,318	Aumenta (2)
		TRPV4	Aumento del daño	1,293	Aumenta (1)
		TNFAIP6	Disminución del daño	1,131	Disminuye (1)
		ADORA3	Aumento del daño	1,129	Aumenta (1)
		IL32	Disminución del daño	-1,084	Aumenta (1)
		IL4	Aumento del daño	-1,614	Disminuye (4)
Lesión aterosclerótica	1,296	PTGES	Aumentadas las lesiones	2,986	Aumenta (2)
		SERPINE1	Afecta	2,333	Afecta (4)
		VEGFA	Aumentadas las lesiones	1,487	Aumenta (4)
		SPP1	Aumentadas las lesiones	1,441	Aumenta (2)
		PLAU	Aumentadas las lesiones	1,203	Aumenta (2)
		THBS1	Afecta	1,109	Afecta (2)
		MMP2	Aumentadas las lesiones	1,063	Aumenta (1)
		IL4	Disminuidas las lesiones	-1,614	Aumenta (2)

**Tabla A4. Principales procesos asociados al Sistema Cardiovascular que estarían disminuidos en las CMSP en pacientes de SCACEST y la predicción del efecto los genes implicados.**

Función	z-score	Genes	Predicción (basado en la dirección de la expresión)	Fold Change	Descrito previamente (nº Referencias)
Vasodilatación	-1,501	ENG	Disminuye la vasodilatación	1,527	Disminuye (1)
		VEGFA	Afecta	1,487	Afecta (5)
		PPARG	Disminuye la vasodilatación	1,393	Disminuye (1)
		TRPV4	Afecta	1,293	Afecta (1)
		PLAU	Aumenta la vasodilatación	1,203	Aumenta (3)
		EDNRB	Afecta	1,117	Afecta (1)
		THBS1	Disminuye la vasodilatación	1,109	Disminuye (1)
		CYP2J2	Disminuye la vasodilatación	-1,201	Aumenta (1)
Dilatación de la cámara del corazón	-1,493	PTGES	Disminuye la dilatación	2,986	Disminuye (1)
		SERPINE1	Disminuye la dilatación	2,333	Disminuye (1)
		SPP1	Disminuye la dilatación	1,441	Disminuye (1)
		MARCKSL1	Disminuye la dilatación	1,357	Disminuye (1)
		NUPR1	Disminuye la dilatación	1,208	Disminuye (1)
		PLAU	Aumenta la dilatación	1,203	Aumenta (1)
		MLXIPL	Afecta	3,031	Afecta (1)

**Tabla A5. Genes expresados diferencialmente en las CMSP de pacientes de SCACEST con algún efecto en alteraciones del Sistema Cardiovascular.**

Función	Genes	Fold Change	Descrito previamente (nº Referencias)
Estenosis	MLXIPL	3,031	Afecta (1)
	SPP1	1,441	Afecta (4)
	PPARG	1,393	Afecta (3)
	FURIN	1,371	Afecta (1)
	GTF2IRD1	1,119	Afecta (1)
	MMP2	1,063	Afecta (3)
Isquemia de miocardio	SERPINE1	2,333	Afecta (1)
	PMEPA1	1,914	Afecta (1)
	IL10	1,802	Afecta (1)
	RBM47	1,724	Afecta (1)
	NKD1	1,666	Afecta (1)
	LGMN	1,657	Afecta (1)
	AMPH	1,590	Afecta (1)

Función	Genes	Fold Change	Descrito previamente (nº Referencias)
	DDR2	1,533	Afecta (4)
	VEGFA	1,487	Afecta (1)
	DOCK4	1,395	Afecta (4)
	PPARG	1,393	Afecta (5)
	BCAT1	1,388	Afecta (1)
	TGFA	1,353	Afecta (3)
	APOC1	1,261	Afecta (1)
	MTHFD1L	1,253	Afecta (13)
	CAMKK1	1,149	Afecta (1)
	MSR1	1,143	Afecta (2)
	TNFAIP6	1,131	Afecta (1)
	CHRNA4	1,130	Afecta (2)
	ADORA3	1,129	Afecta (1)
	THBS1	1,109	Afecta (1)
	FAM176A	1,107	Afecta (1)
	SIAH3	1,081	Afecta (2)
	P2RY6	1,071	Afecta (3)
	MMP2	1,063	Afecta (1)
	MYO10	1,041	Afecta (1)
	PHACTR1	1,013	Afecta (2)
	PARVA	-1,003	Afecta (3)
	MDGA1	-1,015	Afecta (1)
	MYH11	-1,045	Afecta (1)
	KIAA1324	-1,047	Afecta (1)
	EIF4B	-1,067	Afecta (1)
	CPA3	-1,070	Afecta (1)
	YAP1	-1,103	Afecta (1)
	GPM6A	-1,245	Afecta (1)
	CLEC4F	-1,700	Afecta (1)
Enfermedad de la arteria coronaria	PMEPA1	1,914	Afecta (1)
	IL10	1,802	Afecta (1)
	RBM47	1,724	Afecta (1)
	NKD1	1,666	Afecta (1)
	LGMN	1,657	Afecta (1)
	AMPH	1,590	Afecta (1)
	DDR2	1,533	Afecta (4)
	VEGFA	1,487	Afecta (1)
	DOCK4	1,395	Afecta (4)
	PPARG	1,393	Afecta (4)
	BCAT1	1,388	Afecta (1)

Función	Genes	Fold Change	Descrito previamente (nº Referencias)
	TGFA	1,353	Afecta (3)
	APOC1	1,261	Afecta (1)
	MTHFD1L	1,253	Afecta (13)
	CAMKK1	1,149	Afecta (1)
	MSR1	1,143	Afecta (2)
	TNFAIP6	1,131	Afecta (1)
	CHRNA4	1,130	Afecta (1)
	THBS1	1,109	Afecta (1)
	FAM176A	1,107	Afecta (1)
	SIAH3	1,081	Afecta (2)
	P2RY6	1,071	Afecta (3)
	MYO10	1,041	Afecta (1)
	PHACTR1	1,013	Afecta (2)
	PARVA	-1,003	Afecta (3)
	MDGA1	-1,015	Afecta (1)
	MYH11	-1,045	Afecta (1)
	KIAA1324	-1,047	Afecta (1)
	EIF4B	-1,067	Afecta (1)
	CPA3	-1,070	Afecta (1)
	YAP1	-1,103	Afecta (1)
	GPM6A	-1,245	Afecta (1)
	CLEC4F	-1,700	Afecta (1)

**Tabla A6. Principales procesos asociados al Sistema Inmune que estarían aumentados en las CMSP de los pacientes de SCACEST y la predicción del efecto los genes implicados.**

Función	z-score	Genes	Predicción (basado en la dirección de la expresión)	Fold Change	Descrito previamente (nº de Referencias)
Migración de células mieloides	2.054	FN1	Aumenta la migración	2,600	Aumenta (25)
		SERPINE1	Aumenta la migración	2,333	Aumenta (8)
		IL8	Aumenta la migración	2,003	Aumenta (225)
		TGM2	Aumenta la migración	1,916	Aumenta (11)
		SPP1	Aumenta la migración	1,441	Aumenta (18)
		CXCL2	Aumenta la migración	1,270	Aumenta (34)
		PLAU	Aumenta la migración	1,203	Aumenta (19)
		CXCL9	Disminuye la migración	-1,298	Aumenta (49)
		IL4	Disminuye la migración	-1,614	Aumenta (34)



Función	z-score	Genes	Predicción (basado en la dirección de la expresión)	Fold Change	Descrito previamente (nº de Referencias)
Apoptosis de leucocitos mononucleares	1.94	WNT5A	Aumenta la apoptosis	2,963	Aumenta (1)
		IL10	Aumenta la apoptosis	1,802	Aumenta (12)
		VEGFA	Disminuye la apoptosis	1,487	Disminuye (1)
		SPP1	Disminuye la apoptosis	1,441	Disminuye (7)
		IER3	Disminuye la apoptosis	1,276	Disminuye (1)
		SKIL	Aumenta la apoptosis	1,202	Aumenta (1)
		ADORA3	Aumenta la apoptosis	1,129	Aumenta (2)
		THBS1	Aumenta la apoptosis	1,109	Aumenta (1)
		JUN	Aumenta la apoptosis	1,009	Aumenta (1)
		RCAN2	Aumenta la apoptosis	-1,035	Disminuye (1)
		FCER1A	Aumenta la apoptosis	-1,070	Disminuye (3)
		MS4A2	Aumenta la apoptosis	-1,584	Disminuye (2)
		IL4	Aumenta la apoptosis	-1,614	Disminuye (18)
Acumulación de leucocitos	1,709	IL8	Aumenta la acumulación	2,003	Aumenta (3)
		IL10	Disminuye la acumulación	1,802	Disminuye (3)
		VEGFA	Aumenta la acumulación	1,487	Aumenta (3)
		SPP1	Aumenta la acumulación	1,441	Aumenta (2)
		OSM	Aumenta la acumulación	1,318	Aumenta (1)
		IER3	Aumenta la acumulación	1,276	Aumenta (1)
		CXCL2	Aumenta la acumulación	1,270	Aumenta (12)
		PLAU	Aumenta la acumulación	1,203	Aumenta (5)
		CXCL9	Aumenta la acumulación	-1,298	Disminuye (2)
		DSC1	Aumenta la acumulación	-1,359	Disminuye (1)
		IL4	Disminuye la acumulación	-1,614	Aumenta (7)
Apoptosis de monocitos	1.517	IL10	Aumenta la apoptosis	1,802	Aumenta (3)
		ADORA3	Aumenta la apoptosis	1,129	Aumenta (2)
		FCER1A	Aumenta la apoptosis	-1,070	Disminuye (3)
		MS4A2	Aumenta la apoptosis	-1,584	Disminuye (2)
		IL4	Disminuye la apoptosis	-1,614	Aumenta (2)
Quimiotaxis de leucocitos	1.538	WNT5A	Aumenta la quimiotaxis	2,963	Aumenta (1)
		FN1	Afecta	2,600	Afecta (6)
		SERPINE1	Aumenta la quimiotaxis	2,333	Aumenta (1)
		IL8	Aumenta la quimiotaxis	2,003	Aumenta (108)
		IL10	Aumenta la quimiotaxis	1,802	Aumenta (20)
		CCL20	Aumenta la quimiotaxis	1,753	Aumenta (21)
		CXCR7	Aumenta la quimiotaxis	1,727	Aumenta (2)
		VEGFA	Afecta	1,487	Afecta (3)

Función	z-score	Genes	Predicción (basado en la dirección de la expresión)	Fold Change	Descrito previamente (nº de Referencias)
		SPP1	Aumenta la quimiotaxis	1,441	Aumenta (3)
		PPARG	Disminuye la quimiotaxis	1,393	Disminuye (1)
		CXCL2	Aumenta la quimiotaxis	1,270	Aumenta (10)
		PLAU	Aumenta la quimiotaxis	1,203	Aumenta (3)
		ADORA3	Aumenta la quimiotaxis	1,129	Aumenta (1)
		EDNRB	Afecta	1,117	Afecta (1)
		THBS1	Aumenta la quimiotaxis	1,109	Aumenta (2)
		CXCL9	Disminuye la quimiotaxis	-1,298	Aumenta (17)
		IL4	Aumenta la quimiotaxis	-1,614	Disminuye (7)
<b>Migración de Leucocitos</b>	1,364	OLR1	Disminuye la migración	3,894	Disminuye (2)
		PTGES	Aumenta la migración	2,986	Aumenta (3)
		WNT5A	Aumenta la migración	2,963	Aumenta (1)
		FN1	Aumenta la migración	2,600	Aumenta (25)
		SERPINE1	Aumenta la migración	2,333	Aumenta (8)
		IL8	Aumenta la migración	2,003	Aumenta (225)
		TGM2	Aumenta la migración	1,916	Aumenta (11)
		IL10	Disminuye la migración	1,802	Disminuye (57)
		CCL20	Aumenta la migración	1,753	Aumenta (42)
		CXCR7	Aumenta la migración	1,727	Aumenta (2)
		UNC5B	Disminuye la migración	1,595	Disminuye (2)
		VEGFA	Aumenta la migración	1,487	Aumenta (21)
		SPP1	Aumenta la migración	1,441	Aumenta (18)
		PPARG	Disminuye la migración	1,393	Disminuye (2)
		OSM	Aumenta la migración	1,318	Aumenta (3)
		CXCL2	Aumenta la migración	1,270	Aumenta (34)
		PLAU	Aumenta la migración	1,203	Aumenta (19)
		MSR1	Disminuye la migración	1,143	Disminuye (1)
		ADORA3	Aumenta la migración	1,129	Aumenta (3)
		EDNRB	Afecta	1,117	Afecta (1)
		THBS1	Aumenta la migración	1,109	Aumenta (12)
		MCAM	Afecta	1,098	Afecta (1)
		MMP14	Aumenta la migración	1,083	Aumenta (9)
		ITGA9	Aumenta la migración	1,081	Aumenta (1)
		MMP2	Aumenta la migración	1,063	Aumenta (2)
		FCAR	Aumenta la migración	1,054	Aumenta (2)
		NOTCH1	Aumenta la migración	1,024	Aumenta (4)
		LIPA	Aumenta la migración	-1,065	Disminuye (1)
		FCER1A	Disminuye la migración	-1,070	Aumenta (1)
		LCP1	Disminuye la migración	-1,262	Aumenta (9)
		CXCL9	Disminuye la migración	-1,298	Aumenta (49)

Función	z-score	Genes	Predicción (basado en la dirección de la expresión)	Fold Change	Descrito previamente (nº de Referencias)
Infiltración de leucocitos	1,341	RHOD	Disminuye la migración	-1,528	Aumenta (1)
		IL4	Disminuye la migración	-1,614	Aumenta (34)
		PTGES	Aumenta la infiltración	2,986	Aumenta (3)
		FN1	Disminuye la infiltración	2,600	Disminuye (2)
		SERPINE1	Disminuye la infiltración	2,333	Disminuye (1)
		IL8	Aumenta la infiltración	2,003	Aumenta (13)
		TGM2	Aumenta la infiltración	1,916	Aumenta (2)
		IL10	Disminuye la infiltración	1,802	Disminuye (14)
		UNC5B	Disminuye la infiltración	1,595	Disminuye (2)
		SPP1	Aumenta la infiltración	1,441	Aumenta (5)
		OSM	Aumenta la infiltración	1,318	Aumenta (3)
		CXCL2	Aumenta la infiltración	1,270	Aumenta (2)
		PLAU	Aumenta la infiltración	1,203	Aumenta (1)
		MSR1	Disminuye la infiltración	1,143	Disminuye (1)
		THBS1	Disminuye la infiltración	1,109	Disminuye (1)
		MMP14	Aumenta la infiltración	1,083	Aumenta (1)
		MMP2	Aumenta la infiltración	1,063	Aumenta (1)
		FCAR	Aumenta la infiltración	1,054	Aumenta (2)
		LIPA	Aumenta la infiltración	-1,065	Disminuye (1)
		IL4	Aumenta la infiltración	-1,614	Disminuye (1)

**Tabla A7. Principales procesos asociados al Sistema Inmune que estarían disminuidos en las CMSP de los pacientes de SCACEST y la predicción del efecto los genes implicados.**

Función	z-score	Genes	Predicción (basado en la dirección de la expresión)	Fold Change	Descrito previamente (nº de Referencias)
Respuesta de leucocitos mononucleares	-2,304	NCR3	Disminución de la respuesta	-1,207	Aumenta (11)
		OSM	Disminución de la respuesta	1,318	Disminuye (1)
		MERTK	Disminución de la respuesta	1,055	Disminuye (3)
		CXCL9	Disminución de la respuesta	-1,298	Aumenta (1)
		IL4	Disminución de la respuesta	-1,614	Aumenta (11)
		IL10	Disminución de la respuesta	1,802	Disminuye (29)
		PPARG	Disminución de la respuesta	1,393	Disminuye (1)
		MAF	Aumento de la respuesta	-1,168	Disminuye (1)
		MSR1	Aumento de la respuesta	1,143	Aumenta (1)
		LAG3	Afecta	-1,011	Afecta (2)
Respuesta de linfocitos	-2,077	NCR3	Disminución de la respuesta	-1,207	Aumenta (11)

Función	z-score	Genes	Predicción (basado en la dirección de la expresión)	Fold Change	Descrito previamente (nº de Referencias)
		MERTK	Disminución de la respuesta	1,055	Disminuye (3)
		CXCL9	Disminución de la respuesta	-1,298	Aumenta (1)
		IL4	Disminución de la respuesta	-1,614	Aumenta (9)
		IL10	Disminución de la respuesta	1,802	Disminuye (26)
		PPARG	Disminución de la respuesta	1,393	Disminuye (1)
		MAF	Aumento de la respuesta	-1,168	Disminuye (1)
		MSR1	Aumento de la respuesta	1,143	Aumenta (1)
		LAG3		-1,011	Afecta (2)
<b>Reclutamiento de linfocitos T</b>	-1,672	IL8	Afecta	2,003	Afecta (1)
		IL10	Aumento del reclutamiento	1,802	Aumenta (1)
		CCL20	Afecta	1,753	Afecta (1)
		FCER1A	Disminución del reclutamiento	-1,070	Aumenta (1)
		CXCL9	Disminución del reclutamiento	-1,298	Aumenta (3)
		IL4	Disminución del reclutamiento	-1,614	Aumenta (1)
<b>Respuesta inmune de macrófagos</b>	-1,645	SERPINE1	Disminución de la respuesta	2,333	Disminuye (5)
		TGM2	Aumento de la respuesta	1,916	Aumenta (3)
		IL10	Disminución de la respuesta	1,802	Disminuye (1)
		PPARG	Disminución de la respuesta	1,393	Disminuye (1)
		THBS1	Afecta	1,109	Afecta (1)
		IL4	Disminución de la respuesta	-1,614	Aumenta (1)
<b>Fagocitosis</b>	-1,164	SERPINE1	Disminución de la fagocitosis	2,333	Disminuye (5)
		TGM2	Aumento de la fagocitosis	1,916	Aumenta (1)
		PLAU	Disminución de la fagocitosis	1,203	Disminuye (1)
		MSR1	Aumento de la fagocitosis	1,143	Aumenta (1)
		THBS1	Afecta	1,109	Afecta (1)
		IL4	Disminución de la fagocitosis	-1,614	Aumenta (2)
<b>Respuesta inmune de neutrófilos</b>	-1,133	FN1	Aumento de la respuesta	2,600	Aumenta (2)
		SERPINE1	Disminución de la respuesta	2,333	Disminuye (5)
		IL8	Aumento de la respuesta	2,003	Aumenta (1)
		PLAU	Disminución de la respuesta	1,203	Disminuye (1)
		FCAR	Aumento de la respuesta	1,054	Aumenta (1)
		FCER1A	Disminución de la respuesta	-1,070	Aumenta (2)
		IL4	Disminución de la respuesta	-1,614	Aumenta (1)